

Aus dem
Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Angefertigt am Deutschen Herzzentrum München
(Prof. Dr. Adnan Kastrati)

**“Beurteilung der Stenteinheilung mittels Optischer
Kohärenztomographie im atherosklerotischen
Kaninchenmodell und die Übertragbarkeit auf den
Menschen“**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von **Caroline Malle**
aus Regensburg

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

| | |
|-------------------|---------------------------------------|
| Dekan: | Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun |
| Berichterstatter: | Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke |
| Korreferent: | Univ.-Prof. Dr. Manfred Stangassinger |

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meinen Eltern

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 4 |
| 2. Hintergrund..... | 5 |
| 2.1 Atherosklerose..... | 5 |
| 2.1.1 Einführung..... | 5 |
| 2.1.2 Pathogenese | 5 |
| 2.1.3 Einteilung | 6 |
| 2.1.4 Risikofaktoren und klinische Symptomatik | 8 |
| 2.2 Bedeutung in der Tiermedizin..... | 9 |
| 2.3 Einsatz von atherosklerotischen Tiermodellen zur Erforschung der Stenteinheilung | 10 |
| 2.3.1 Kaninchenmodell | 11 |
| 2.3.2 Schweinmodell | 12 |
| 2.3.3 Maus- und Rattenmodell..... | 13 |
| 2.3.4 Primatenmodell | 14 |
| 2.4 Diagnostische Verfahren zum Nachweis atherosklerotischer Gefäßveränderungen . | 15 |
| 2.4.1 Koronarangiographie..... | 15 |
| 2.4.2 Optische Kohärenztomographie (OCT) | 16 |
| 2.5 Therapiemöglichkeiten der Atherosklerose/Koronaren Herzkrankheit | 18 |
| 2.5.1 Perkutane Koronarintervention (PCI) | 18 |
| 2.5.2 Stentimplantation | 19 |
| 2.5.3 Medikamentöse Therapie | 21 |
| 2.6 Stentsysteme und ihre klinische Bedeutung..... | 22 |
| 2.7 Mechanismen der Stenteinheilung in atherosklerotisch veränderten Gefäßen des Menschen | 25 |
| 2.8 Zielsetzung dieser Arbeit | 28 |
| 3. Material und Methoden | 29 |
| 3.1 Tiermodell | 29 |
| 3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung | 29 |
| 3.1.2 Stentauswahl und Gruppeneinteilung..... | 29 |
| 3.1.3 Fütterung einer cholesterinreichen Diät | 31 |
| 3.2 Arterielle Denudation..... | 32 |
| 3.3 Stentimplantation | 34 |
| 3.4 Blutentnahmen und antithrombozytäre Therapie..... | 35 |

| | |
|--|----|
| 3.5 Versuchsende | 36 |
| 3.6 Untersuchung der Gefäße mittels Optischer Kohärenztomographie..... | 38 |
| 3.7 Gefäßentnahme und Fixierung der gestenteten Gefäßsegmente | 39 |
| 3.8 Histologische Aufbereitung der Proben | 39 |
| 3.8.1 Methylnmetacrylat – Einbettung..... | 39 |
| 3.8.2 Anfertigung von histologischen Schnitten | 40 |
| 3.8.3 Modifizierte Movat-Pentachrom-Färbung | 41 |
| 3.8.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung..... | 43 |
| 3.9 Histopathologische Auswertung | 44 |
| 3.10 Auswertung der OCT Aufnahmen und Korrelation mit histologischen Schnitten .. | 47 |
| 3.11 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der gestenteten Gefäßsegmente ... | 50 |
| 3.12 Etablierung der Graustufenmessung zur Gewebecharakterisierung mittels OCT ... | 52 |
| 3.13 Humane OCT Daten..... | 54 |
| 3.14 Statistische Auswertung | 55 |
| 4. Ergebnisse | 58 |
| 4.1 Präklinische Daten..... | 58 |
| 4.1.1 Blutparameter | 58 |
| 4.1.2 Histologische Ergebnisse nach 28 Tagen..... | 60 |
| 4.1.2.1 Morphometrie..... | 60 |
| 4.1.2.2 Einheilungsparameter..... | 61 |
| 4.1.3 Histologische Ergebnisse nach 42 Tagen..... | 62 |
| 4.1.3.1 Morphometrie..... | 62 |
| 4.1.3.2 Einheilungsparameter..... | 64 |
| 4.1.4 präklinische OCT Ergebnisse..... | 65 |
| 4.1.4.1 OCT Daten nach 28 Tagen..... | 65 |
| 4.1.4.2 OCT Daten nach 42 Tagen..... | 66 |
| 4.1.4.3 Validierung der OCT Messung anhand der Histologie | 66 |
| 4.2 Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse nach 28 Tagen | 70 |
| 4.3 Klinische Daten | 70 |
| 4.3.1. Patientendaten | 70 |
| 4.3.2 klinische OCT Daten nach 6 Monaten | 71 |
| 4.4 Vergleich präklinischer und klinischer OCT Daten | 71 |

| | |
|--|-----|
| 4.4.1 DES nach 28 Tagen (präklinisch) und 6 Monaten (klinisch)..... | 71 |
| 4.4.2 DES nach 42 Tagen (präklinisch) und 6 Monaten (klinisch) | 74 |
| 4.5 Ergebnisse der Gewebecharakterisierung mittels Graustufenmessung..... | 76 |
| 5. Diskussion | 78 |
| 5.1 Validierung des OCT als Untersuchungsmethode der Stenteinheilung | 79 |
| 5.2 Vergleich von präklinischen mit klinischen OCT Daten | 80 |
| 5.3 Gewebecharakterisierung mittels Graustufenmessung im OCT | 82 |
| 5.4 Beurteilung der Stenteinheilung mittels Histologie und OCT im atherosklerotischen Kaninchenmodell | 83 |
| 6. Zusammenfassung..... | 85 |
| 7. Summary | 87 |
| 8. Abbildungsverzeichnis | 89 |
| 9. Tabellenverzeichnis..... | 91 |
| 10. Literaturverzeichnis..... | 92 |
| 11. Anhang | 105 |
| 11.1 Abkürzungsverzeichnis | 105 |
| 11.2 Implantationsmatrix | 106 |
| 11.2.1 Untersuchung mittels Histologie und OCT nach 28 und 42 Tagen | 106 |
| 11.2.2 Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskopie nach 28 Tagen..... | 107 |
| 11.3 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien | 107 |
| 11.4 Protokolle zur Herstellung der Färbelösungen/sonstige Reagenzien | 109 |
| 12. Danksagung..... | 112 |

1. Einleitung

Herz-/Kreislauferkrankungen stehen bereits seit Jahren in der Statistik der Todesursachen in Deutschland an erster Stelle. So auch im Jahre 2010, in dem 41,1% aller Sterbefälle hierdurch verursacht wurden (Statistisches Bundesamt 2011). Dabei stellt die Koronare Herzkrankheit (KHK), welche in erster Linie durch Atherosklerose hervorgerufen wird, nicht nur in Deutschland, sondern weltweit eine der führenden Todesursachen dar (World Health Organization 2011). Unter ihr versteht man das Vorkommen atherosklerotischer Veränderungen mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung der epikardialen Koronararterien. Durch die hierbei entstehende Mangel durchblutung betroffener Myokardabschnitte kommt es zum Missverhältnis von Sauerstoffbedarf und –zufuhr und somit zu regionalen myokardialen Ischämien (Baer und Rosenkranz 2009; Mörl et al. 1998). Seit ihrer ersten Anwendung im Jahre 1977, hat sich die perkutane koronare Intervention (PCI) mit primärem Balloneinsatz und zusätzlicher Stentimplantation zur Behandlung solcher Engstellen oder Verschlüsse, als Interventionsmethode erster Wahl etabliert (Benzer 2009; Winkhardt 2005). Durch den Einsatz einfacher Metallstents (Bare-metal Stent = BMS) wurde eine dauerhafte Stabilisierung der Gefäßwand erreicht. Ein Nachteil hierbei war allerdings die übermäßige Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, die zu einer erneuten Restenosierung des Gefäßes (Serruys et al. 1994) führte. Durch die Einführung neuartiger, mit antiproliferativen Medikamenten beschichteter Stents (Drug-eluting Stents = DES) im Jahre 2003, kam es zu einem signifikanten Abfall der Restenoserate (Colombo et al. 2003; Holmes et al. 2004). Gleichzeitig führten sie aber auch zu einer deutlich verzögerten Gefäßheilung und somit zu einem Anstieg der Stentthromboserate. Um das Risiko solch einer Gefäßokklusion zu minimieren, wird nach der Implantation eines DES eine längerfristige, begleitende duale antithrombozytäre Therapie empfohlen (Joner et al. 2006; Heller und Dangas 2010). Da diese jedoch mit der Gefahr von Blutungskomplikationen einhergeht, besteht die Notwendigkeit neue Untersuchungsmethoden zu entwickeln, mit denen die Stenteinheilung zu jedem Zeitpunkt zuverlässig beurteilt und dadurch die Dauer der risikobehafteten dualen antithrombozytären Therapie für jeden Patienten individuell angepasst werden kann.

2. Hintergrund

2.1 Atherosklerose

2.1.1 Einführung

Die World Health Organization (WHO) bezeichnet die Atherosklerose als eine „variable Kombination von Intimaveränderungen (der Arterien), bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen (Kalkablagerungen), verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (Bühling 2008).

Sie ist durch ein chronisches Entzündungsgeschehen gekennzeichnet und betrifft vor allem große Arterien wie die Aorta, die Koronararterien, die Karotiden, die Nierenarterien sowie die Becken- und Beinarterien. Da jedoch auch alle anderen Arterien des systemischen Kreislaufs atherosklerotische Läsionen entwickeln können, muss sie stets als eine generalisierte Erkrankung angesehen werden (Steffel et al. 2011).

Im heutigen Sprachgebrauch werden die Begriffe Arteriosklerose und Atherosklerose oft synonym verwendet. Dabei stellt die Arteriosklerose den Oberbegriff für eine Reihe von Arterienerkrankungen dar. Hierzu zählen als wichtigste Form die Atherosklerose, die Mönckeberg-Mediaverkalkung und die Arteriolo-sklerose/-hyalinose (Böcker et al. 2008).

2.1.2 Pathogenese

Die Pathogenese der Atherosklerose ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt und es bestehen diesbezüglich mehrere Theorien. Die bekannteste ist hierbei die „Response-To-Injury-Hypothesis“, welche bereits 1856 von Rudolf Virchow aufgestellt wurde (Virchow 1856). Darin zeichnet sich eine endotheliale Dysfunktion durch eine geringere Bioverfügbarkeit an Vasodilatoren (vor allem Stickoxid (NO)) sowie einem proinflammatorischen, proliferativen und prokoagulatorischen Zustand des Endothels aus (Bonetti et al. 2003; Anderson

1999). Dieser kann durch unterschiedlichste Stimuli wie z.B. Rauchen, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus oder Hypertension hervorgerufen werden (Celermajer et al. 1992; Libby et al. 2002). Aufgrund der endothelialen Dysfunktion und der damit verbundenen Schädigung der Endothelzellbarriere, kommt es zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1) und verschiedenen Wachstumsfaktoren (VEGF, TF, vWF) an der Endotheloberfläche. Nach der Adhäsion von Monozyten und T-Lymphozyten wird deren Migration in die Gefäßwand durch den Einfluss von weiteren Wachstumsfaktoren (PDGF, IL-1, TNF α) und chemischen Lockstoffen/Entzündungsmediatoren (MCP-1) gefördert (Libby et al. 2002; Ross 1993; Steffel et al. 2006). Anschließend wandeln sich die Monozyten zu Makrophagen um, welche oxidiertes LDL (low density lipoprotein) aufnehmen und sich so zu Schaumzellen weiterentwickeln. Diese bilden schließlich, zusammen mit den Lymphozyten, eines der ersten Stadien der Atherosklerose, die sog. „fatty streaks“ (Faggiotto et al. 1984; Masuda und Ross 1990a, 1990b).

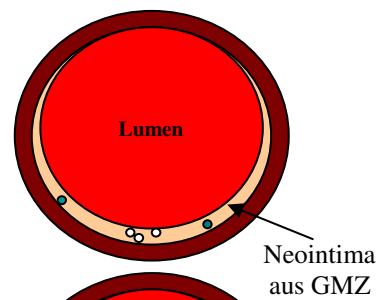
Sie treten beim Menschen bereits in den ersten zehn Lebensjahren in der thorakalen und abdominalen Aorta auf. Ab dem 15. Lebensjahr sind sie auch in den Koronararterien zu finden (Burke et al. 2002).

2.1.3 Einteilung

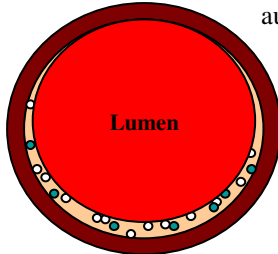
Die Verlaufsstadien der Atherosklerose können mittels verschiedener Kriterien in zwei Gruppen eingeteilt werden:

- **Histopathologische Einteilung der Atherosklerose:**

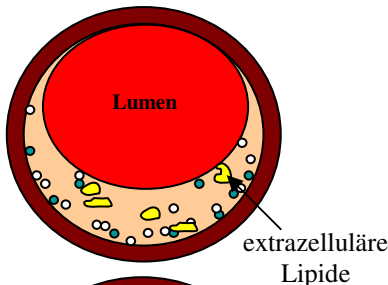
Die Atherosklerose wurde von der American Heart Association (AHA) anhand morphologischer Kriterien in insgesamt sechs Stadien unterteilt (Stary et al. 1995). Diese werden in der nachfolgenden Abbildung graphisch dargestellt (modifiziert nach Virmani et al. 2001).



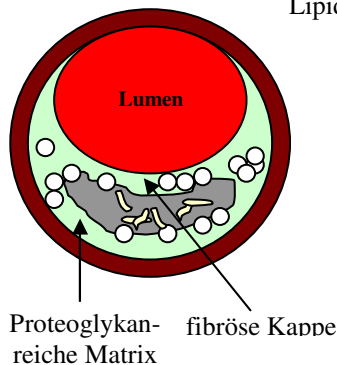
Stadium I („initial lesion“): geringgradige Verdickung der Neointima durch Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (GMZ), kleine Ansammlungen von Makrophagen ● und Schaumzellen ○
(Stary 1987, Stary et al. 1994; Virmani et al. 2001)



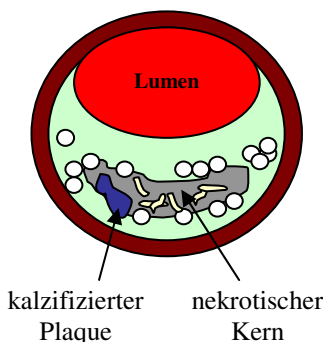
Stadium II: vermehrte Ansammlungen von Makrophagen, Schaumzellen und T-Lymphozyten in der Neointima (=“fatty streaks“)



Stadium III („intermediate lesion“, „transitional lesion“ oder „preatheroma“): Verdickung der Neointima mit extrazellulären Lipidtröpfchen
(Stary et al. 1994)



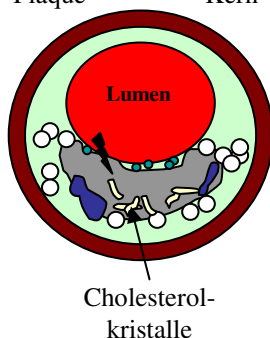
Stadium IV: Bildung eines von Schaumzellen umgebenen Lipidkerns bzw. nekrotischen Kerns aus Cholesterinester, freiem Cholesterin, Phospholipiden sowie Triglyzeriden. Die Abgrenzung zum Lumen bildet eine proteoglykanreiche Matrix mit Kollagen und glatten Gefäßmuskelzellen (= fibröse Kappe).
(Virmani et al. 2001)



Stadium Va: fortschreitende Verdickung der fibrösen Kappe

Stadium Vb: mit auftretenden Kalzifizierungen
(Abb. links)

Stadium Vc: Resorption des Lipidkerns bzw. des nekrotischen Kerns mit Umbau der fibrösen Kappe durch kollagenes Bindegewebe
(Burke et al. 2002; Stary et al. 1995)



Stadium VIa: fibröse Kappe wird immer dünner und reißt schließlich ein (Abb. links)

Stadium VIb: zusätzliche Bildung eines Hämatoms oder einer Blutung

Stadium VIc: zusätzliche Entstehung eines luminalen Thrombus

Typ VIabc: gleichzeitiges Vorhandensein all dieser Ereignisse
(Burke et al. 2002; Stary et al. 1995)

Abbildung 1: schematische Darstellung der Atherosklerosestadien

- **Diagnostische Einteilung der Atherosklerose:**

Anhand der AHA/ACC-Klassifikation (American Heart Association/American College of Cardiology) erfolgte eine angiographische Einteilung in die Typen A, B1, B2 und C. Hierbei wurden die angiographischen Erscheinungsformen, die Erfolgsaussichten einer PTCA (Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie) sowie deren Komplikationsrate berücksichtigt (Schmid 2002). Je nach Ausmaß der Stenosierung, dem Vorhandensein von Seitästen, Thromben oder einem stark geschlängelten Gefäßverlauf, spricht man von einer einfachen (Typ A) oder einer komplizierten Läsion (Typ C).

2.1.4 Risikofaktoren und klinische Symptomatik

Bei der Atherogenese handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen (Finking und Hanke 1997). Typische Risikofaktoren, welche das Auftreten von atherosklerotischen Läsionen begünstigen sind Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hypertonie, Adipositas und Bewegungsmangel, erhöhter LDL- und erniedrigter HDL-Spiegel (high density lipoprotein), erhöhter C-reaktives Protein (CRP)- und Homocystein-Spiegel, psychische Erkrankungen sowie familiäre Belastungen (Celermajer et al. 1992; Lusis 2000).

Aber auch das Geschlecht und das Alter können ausschlaggebend sein. So ist laut Lusis (2000) das Risiko eine KHK zu entwickeln bei Männern über 60 Jahren doppelt so hoch wie bei Frauen desselben Alters. Eine wichtige Rolle scheinen hierbei die Östrogene der Frau zu spielen, welche die Akkumulation von Schaumzellen während der Plaquebildung verhindern (Burke et al. 1998).

Die Erkrankung selbst verläuft meist still und asymptomatisch. Zu klinischen Symptomen kommt es erst bei einer Stenosierung des Gefäßes aufgrund einer Plaquebildung um mindestens 50 % (Virmani et al. 2001) oder nach Entstehung eines koronaren Thrombus (Badimon 2001).

Die Folgen solch einer Gefäßeinengung sind, je nach Ausmaß und Lokalisation, eine periphere oder myokardiale Ischämie, ein akuter Myokardinfarkt, Schlaganfall oder ein plötzlicher Herztod (Greenland et al. 2003; Lloyd-Jones et al. 1999; Virmani et al. 2001). Die Patienten verspüren typischerweise ein

Engegefühl hinter dem Brustbein (Angina pectoris) das häufig mit einer Ausstrahlung in die Innenseite des linken Armes einhergeht. Weitere Symptome sind Herzschmerzen, Atemnot bei Anstrengung sowie Herzrhythmusstörungen (Middeke 2002).

2.2 Bedeutung in der Tiermedizin

Laut Dahme und Weiss (2007) spielen Lipideinlagerungen und atheromatöse Arterienwandnekrosen bei Pflanzenfressern, keine große Rolle. Weshalb dies so ist wird zwar nicht explizit genannt, doch könnte dieser Umstand durchaus auf den geringen Cholesteringehalt der pflanzlichen Nahrung zurückzuführen sein. Ausgeprägte Sklerosen, welche Zirkulationsstörungen hervorrufen, sind eher auf chronische Hyperkalzämien zurückzuführen. Diese ähneln in fortgeschrittenen Stadien der MÖNCKEBERGschen Sklerose an den Beinarterien des Menschen. Bei den Gefäßerkrankungen kommt die Arteriosklerose des Schweins der des Menschen am nächsten. Aufgrund der kurzen Lebenserwartung dieser Tiere, von maximal fünf bis sechs Jahren, lassen sich hier jedoch nur Frühstadien in der Aorta abdominalis und den Zerebralarterien nachweisen.

Auch Meurer und Wolf (2007) sind der Ansicht, dass die Schlachtung landwirtschaftlicher Nutztiere vor Erreichen ihres natürlichen Alters eine Ursache dafür darstellt, weshalb die Arteriosklerose nur für wenige Tierarten beschrieben ist.

Beim Hund kommt eine milde Form der Arteriosklerose recht häufig vor, führt aber aufgrund des gemäßigten Verlaufes selten zu klinischen Symptomen. Prädisponierende Faktoren für deren Entstehung sind neben idiopathisch familiären Lipidstoffwechselkrankheiten einiger Rassen, auch die Hypothyreose in Verbindung mit hohen VLDL-Blutwerten (very low density lipoprotein) (Arnold-Gloor und Niemand 2006; Johnson 2005). Bei älteren Vögeln, wie z.B. Papageien, Greifvögeln und Tauben kann die Erkrankung aber auch durchaus ernstere Verlaufsformen annehmen. Diese sind dann durch Störungen des Gleichgewichts mit Fallen von der Sitzstange und plötzlichen Todesfällen gekennzeichnet (Meurer und Wolf 2007).

Aufgrund der zunehmend besseren medizinischen Versorgung der Haustiere und der dadurch ansteigenden Lebenserwartung, könnten die Atherosklerose und deren Behandlung in Zukunft jedoch auch in der Tiermedizin einen wichtigen Stellenwert einnehmen.

2.3 Einsatz von atherosklerotischen Tiermodellen zur Erforschung der Stenteinheilung

Bei Patienten mit dem klinischen Symptom der Angina pectoris dienen Stentimplantationen dazu, atherosklerotisch verengte Gefäßabschnitte wieder zu eröffnen und damit den physiologischen Blutfluss aufrecht zu erhalten. Da die Stenteinheilung in solch pathologisch veränderten Gefäßen aufgrund der Plaqueablagerungen, der vermehrten Ansammlung von Entzündungszellen und der verzögerten Endothelialisierung jedoch deutlich langsamer von statten geht als in gesunden (Virmani et al. 2003), sind atherosklerotische Tiermodelle zur Erforschung der Gefäßreaktionen nach einer Stentimplantation unerlässlich. Für die Induktion dieser atherosklerotischer Läsionen existieren verschiedene Ansätze:

- a) Spontan (genetisch)
- b) Fütterungsbedingt
- c) Genetisch verändert
- d) Kombination aus b und c

Das ideale Tiermodell zur Erforschung der Atherosklerose beim Menschen sollte gleichzeitig mehreren Anforderungen genügen. Neben geringen Kosten, einfachen Haltungsbedingungen, geringer Größe der Tiere, hoher Fruchtbarkeit und einem gut definierten genetischen Hintergrund, sollten die Tiere auch atherosklerotische Läsionen entwickeln, die denen im Menschen entsprechen. Dazu zählen auch Komplikationen wie Kalzifizierungen, Erosionen, Ulzerationen, Hämorrhagien, Plaquerupturen, Thrombosen, Stenosen und Aneurysmen (Moghadasian et al. 2001).

Unter der Vielzahl von Tiermodellen wurden das Schweine- und Kaninchenmodell von der FDA (US Food and Drug Administration) offiziell als Tiermodelle zur Erforschung von humanen Stentimplantaten anerkannt und nehmen somit einen besonderen Stellenwert ein (FDA 2008).

2.3.1 Kaninchenmodell

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts ging man davon aus, dass die Atherosklerose durch eine vermehrte Aufnahme tierischer Proteine hervorgerufen wird. Aufgrund dieser Annahme begann der russische Wissenschaftler Alexander Ignatowski bereits 1908, Kaninchen mit Milch, Fleisch und/oder mit Eiern angereicherten Diäten zu füttern (Kritchevsky 1995; Moghadasian et al. 2001).

Im Jahre 1913 bewies Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow anhand von cholesterinreich gefütterten Kaninchen, dass nicht die Proteine, sondern das Cholesterin in der Nahrung für atherosklerotische Veränderungen der Intima ausschlaggebend ist. Des Weiteren zeigte er den proportionalen Zusammenhang zwischen der Menge des aufgenommenen Cholesterins und dem Grad der atherosklerotischen Läsionen auf (Finking und Hanke 1997).

Dies bestätigten auch Kolodgie et al. (1996) in einem Versuch, indem sie Kaninchen Futter mit unterschiedlichen Cholesteringehalten über einen längeren Zeitraum (31 Wochen) anboten. Es zeigte sich, dass auf diese Art und Weise verschiedene atherosklerotische Stadien (von fatty streaks (Stad I) bis transitionellen Läsionen (Stad III)) erzeugt werden konnten, welche denen im Menschen sehr nahe kamen.

Durch eine zusätzliche Gefäßverletzung mittels Ballonkatheter ist es schließlich gelungen, auch mit einer verkürzten cholesterinreichen Fütterung (16 Wochen), fortgeschrittene Läsionen hervorzurufen (bis Stad IV).

Im Gegensatz zum Menschen weisen sie allerdings eine vermehrte Anzahl an Schaumzellen und Makrophagen auf (Badimon 2001).

Eine weitere Möglichkeit zur Erforschung der Atherosklerose bietet das so genannte WHHL-Kaninchen (Watanabe Heritable Hyperlipidemic).

Während ihrer wissenschaftlichen Arbeit entdeckten Kondo und Watanabe (1975) ein Kaninchen, dessen Blutserum trotz Fütterung eines normalen Standardfutters, sehr hohe Werte an Total-Cholesterin, β -Lipoproteinen und Total-Lipiden aufwies. Dabei zeigte sich, dass diese Hyperlipidämie auf einer rezessiv vererbten Genmutation beruht, welche, ähnlich der familiären Hypercholesterinämie des Menschen, zu einem LDL-Rezeptormangel führt (Fowler et al. 1991; Shiomi et al. 1987; Tanzawa et al. 1980).

Aufgrund dieser Entdeckung etablierte Watanabe 1975 eine Zuchtlinie, die bis heute der Erforschung der familiären Hypercholesterinämie dient (Kondo und Watanabe 1975).

Ein weiteres transgenes Tiermodell stellt das humane apolipoprotein(a) exprimierende Kaninchen dar. Im Gegensatz zum WHHL-Kaninchen entstehen bei diesen Tieren atherosklerotische Läsionen in der Aorta, den Iliakalarterien und den Karotiden aber nur dann, wenn eine zusätzliche cholesterinhaltige Diät angeboten wird (Fan et al. 2001).

Da Kaninchen nicht in der Lage sind ihre Sterolexkretion aus den Leberzellen zu erhöhen, entwickeln sie durch entsprechende Fütterung sehr schnell hohe Plasmacholesterin-Konzentrationen (bis 22-fach erhöhte Werte nach einer Woche Fütterung von 1 % iger Cholesterindiät) sowie atherosklerotische Läsionen und gehören damit zu den wichtigsten Tiermodellen in der Atheroskleroseforschung (Kolodgie et al. 1996).

Weitere Vorteile sind die geringen Anschaffungs- und Haltungskosten, das einfache Handling sowie die gute Erreichbarkeit und Größe der Gefäße.

2.3.2 Schweinmodell

Das Schweinmodell ist ebenfalls ein sehr häufig verwendetes Tiermodell, welches bei der Erforschung der Atherosklerose und Stenteinheilung verwendet wird. Durch eine cholesterinreiche Fütterung kommt es bei diesen Tieren zu einem raschen Cholesterinanstieg im Plasma sowie zur Ausbildung

atherosklerotischer Läsionen, die denen des Menschen entsprechen (Cullen et al. 2003; Smet et al. 1998).

Ein weiterer Vorteil ist die anatomische und histologische Ähnlichkeit der Schweinekoronarien mit den menschlichen Koronarien (Swindle et al. 1986).

Jedoch muss beachtet werden, dass Schweine während der Versuche schnell wachsen. Dies wirkt sich auch auf den Gefäßdurchmesser aus und macht somit einen direkten Vergleich der Stenteinheilung zwischen Schwein und Mensch schwierig (Gyöngyösi et al. 2004). Auch die relativ hohen Haltungskosten und das aufwendige Handling der Tiere müssen bei der Auswahl dieses Modells beachtet werden (Badimon 2001).

Des Weiteren zeigten Wilson et al. (2009), dass eine Stentimplantation bei diesen Tieren, im Gegensatz zum Menschen, mit einer überschießenden Neointimaproliferation, massiven Entzündungsreaktionen und einer schnelleren Re-Endothelialisierung einhergeht.

2.3.3 Maus- und Rattenmodell

Ihr gut definierter genetischer Hintergrund, die günstige Haltung, das einfache Handling sowie die hohe Fortpflanzungsrate und kurze Generationsfolge machten die Maus schon immer zu einem beliebten Versuchstier für unterschiedlichste Experimente.

Da die meisten Nagetiere aufgrund ihrer niedrigen Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein (CETP)- Aktivität und der damit hervorgerufenen hohen Plasmakonzentration an HDL-Cholesterin keine futterinduzierte Atherosklerose entwickeln, müssen die Läsionen mittels Katheterdenudation hervorgerufen werden (Fingerle et al. 1990; Fowler et al. 1991; Moghadasian et al. 2001). Die daraus resultierenden Neointimahyperplasien weisen jedoch nur geringe Übereinstimmungen mit den atherosklerotischen Veränderungen des Menschen auf (Lafont und Faxon 1998).

Ein weiterer Ansatz zur Erzeugung atherosklerotischer Läsionen war die Züchtung verschiedener transgener Mauslinien, welche spontan oder mit begleitender Cholesterinfütterung atherosklerotische Läsionen entwickeln

(Mezdour et al. 1997; Purcell-Huynh et al. 1995; Véniant et al. 1998). Das bekannteste und am weitesten verbreitete Mausmodell ist das Apo E-Knock-Out-Modell (Moghadasian et al. 2001; Zhang et al. 1992). Allerdings weisen die induzierten atherosklerotischen Läsionen einige Unterschiede zu den Plaqueablagerungen im Menschen auf, was dieses Modell zur Erforschung der Stenteinheilung eher ungeeignet erscheinen lässt (Cullen et al. 2003).

1973 gelang es Koletsky (1973) erstmals eine fettleibige Ratte zu züchten, die neben einer spontanen Hypertension, auch eine frühzeitige Atherosklerose ausbildet. Durch die Weiterentwicklung dieser Linie entstand die JCR:LA-cp Ratte. Diese Tiere besitzen das autosomal rezessive cp-Gen, welches bei homozygotem Vorkommen (cp/cp) zu einer Sensitivität der Tiere gegenüber cholesterinhaltigem Futter führt. Neben sämtlichen Formen atherosklerotischer Läsionen entwickeln diese Tiere zudem eine gesteigerte Nahrungsaufnahme, Fettleibigkeit und milden Diabetes Typ 2 (Russell und Amy 1986, Russel et al. 1998).

Die Nachteile der Maus- und Rattenmodelle liegen vor allem in der geringen Größe der Tiere und ihrer Gefäße begründet.

Aufgrund der extrem kleinen Aorten und der damit verbundenen Komplexität des operativen Eingriffs, kommt es häufig zu Blutungskomplikationen und zum Tod der Tiere (Finn et al. 2002; Lowe et al. 2005). Zudem können für die Implantation keine kommerziell erhältliche Stents verwendet werden. Die speziellen Anfertigungen mit reduziertem Durchmesser sind aufgrund der manuellen Herstellung sehr teuer und lassen sich oftmals nur unzureichend in den Gefäßen aufdehnen.

2.3.4 Primatenmodell

Geary et al. (1996) beschreiben in einer Studie mit Primaten, dass atherosklerotische Läsionen, hervorgerufen durch cholesterinhaltige Fütterung und zusätzlicher Gefäßverletzung, eine erhebliche Ähnlichkeit zum Menschen aufweisen. Jedoch ist die Bildung solcher Läsionen von den genetischen Faktoren

der einzelnen Spezies abhängig und kann mehrere Monate oder sogar Jahre in Anspruch nehmen (Mondy et al. 1997; Rudel 1997). Aufgrund dieser langen Zeitspanne und weiterer wichtiger Faktoren, wie dem schwierigen Handling, die geringe Verfügbarkeit an Tieren, hoher Haltungskosten und vor allem wegen der ethischen Vertretbarkeit und rechtlichen Vorgaben (Tierschutzgesetz; EU VO 63/2010), werden sie heute kaum zur Erforschung der Atherosklerose sowie der Stenteinheilung herangezogen (Lafont und Faxon 1998; Moghadasian et al. 2001).

2.4 Diagnostische Verfahren zum Nachweis atherosklerotischer Gefäßveränderungen

2.4.1 Koronarangiographie

Die Koronarangiographie gilt derzeit als Goldstandard zur diagnostischen Untersuchung der Koronaranatomie. Durch die Gabe von Kontrastmittel über einen vorgelegten Herzkatheter, können anhand von zwei-dimensionalen Bildern Lokalisation, Länge, Schweregrad und Art der Gefäßobstruktion (Atherom, Thrombus, Dissektion, Spasmus und Muskelbrücke) in den epikardialen Arterien identifiziert werden (Bonzel und Hamm 2009).

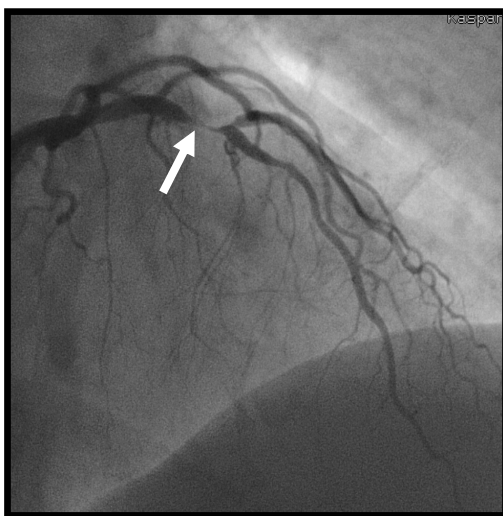


Abbildung 2: angiographische Darstellung einer hochgradig stenosierten Koronararterie im Menschen (Pfeil)

Allerdings ist ihre Aussagekraft bezüglich des Gefäßwandaufbaus aufgrund der zwei-dimensionalen Darstellung beschränkt. Auch die Funktionalität und Qualität von neointimalem Gewebe über den Stentstreben kann anhand angiographischer Bilder nicht beurteilt werden (Tahara et al. 2011).

2.4.2 Optische Kohärenztomographie (OCT)

Bei der Optischen Kohärenztomographie (OCT) handelt es sich um ein invasives, bildgebendes Verfahren, das mit niedrig-kohärentem Licht im nahen Infrarot-Bereich (Wellenlänge 1300 nm) arbeitet. Die ausgesendeten Lichtwellen werden dabei von den umliegenden Geweben reflektiert und deren Intensität bildlich dargestellt (Regar et al. 2003). Die Eindringtiefe beträgt, je nach Gewebekomposition, 1 bis 1,5 mm (Nieves et al. 2010). Der ein-dimensionale Vorläufer der optischen Kohärenztomographie wurde ursprünglich zur Darstellung von Beschädigungen in Glasfaserkabeln und Netzwerkkomponenten konzipiert (Takada et al. 1987). In den frühen 90iger Jahren folgte dann die Weiterentwicklung des Systems zu einem zwei-dimensionalen bildgebenden Verfahren. Klinische Anwendung fand das OCT zuerst in der Ophthalmologie (Hrynchak und Simpson 2000). Heute kommt es auch in der Kardiologie zur Darstellung und Beurteilung von Gefäßen und Stentimplantaten zum Einsatz (Grube 2002; Tearney et al. 1996).

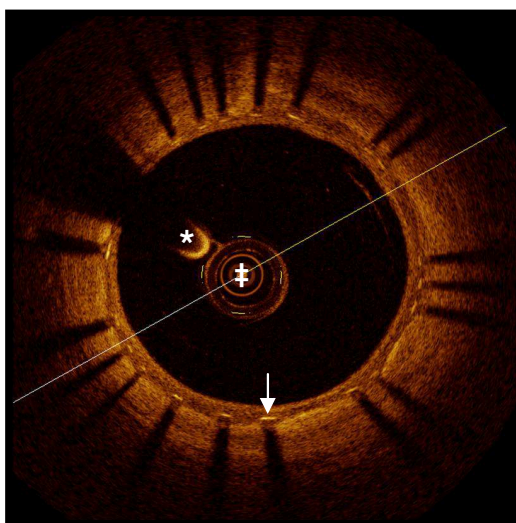


Abbildung 3: OCT Bild (Frame) eines gestenteten Gefäßes mit Neointimabildung
Pfeil = Stentstrebe; * = Führungsdraht; ‡ = OCT Katheter

Da Blut im OCT zu einer multiplen Streuung und hochgradigen Abschwächung des Signals führt ist es wichtig, bei der Untersuchung eine Blutleere des Gefäßes zu erzeugen (Jang et al. 2002; Kume et al. 2006a).

Während die OCT Systeme der ersten Generation (time-domain OCT) hierfür einen kurzzeitigen Verschluss des Gefäßes mittels Ballonokklusion erforderten, konnten die Systeme der zweiten Generation (Fourier-domain OCT), dank einer Erhöhung der Rückzugsgeschwindigkeit von 1 mm/s auf 20 mm/s (Lightlab C7-XR), auf diese Okklusion verzichten. Stattdessen wird die Blutleere nun durch eine stoßweise Spülung des Gefäßes mit Kontrastmittel oder Ringer-Infusionslösung erreicht (Jang et al. 2005; Prati et al. 2010; Yamaguchi et al. 2008).

Mit Hilfe des OCT Verfahrens können sämtliche Strukturen im Gefäßlumen und in der Gefäßwand dargestellt und identifiziert werden. Dazu zählen unter anderem die Detektion von Thromben und Plaquerupturen sowie die Unterscheidung verschiedener Plaquezusammensetzungen (Barlis et al. 2008; Kume et al. 2006a, 2006b; Yabushita 2002). Darüber hinaus stellt es zurzeit die einzige Untersuchungsmethode dar, um fibröse Kappen in vivo präzise zu beurteilen (Manfrini et al. 2006). Ein weiterer Vorteil dieser Technologie ist die Messbarkeit einzelner Gefäßparameter, wie z.B. die Neointimafläche und –dicke über den Streben. Die Bestimmung der Anzahl der unbedeckten Streben bietet zudem die Möglichkeit, die Einheilung von Stents nach einer Implantation zu bewerten (Kume et al. 2005; Murata et al. 2010; Tahara et al. 2011). Lediglich die dünne Endothelzellschicht kann nicht per OCT dargestellt werden, da sie unterhalb des Auflösungsbereichs liegt (Gutiérrez-Chico et al. 2011). Derzeit bestehen jedoch Bestrebungen, die axiale Auflösungsgrenze auf unter 1 μm herabzusetzen. Erste ex vivo Daten des so genannten Micro-OCT deuten auf eine viel versprechende Weiterentwicklung in diese Richtung hin. Mit diesem Verfahren war es sogar gelungen, einzelne Entzündungszellen an der luminalen Gefäßseite zu detektieren (Liu et al. 2011).

2.5 Therapiemöglichkeiten der Atherosklerose/Koronaren Herzkrankheit

2.5.1 Perkutane Koronarintervention (PCI)

Die Perkutane Koronarintervention (PCI) oder auch Ballonangioplastie genannt, ist ein invasives Verfahren, dass zur Erweiterung eingeengter Gefäßabschnitte sowie zur Wiedereröffnung totaler Gefäßverschlüsse eingesetzt wird (Zähringer 2006).

Sie wurde erstmals erfolgreich 1977 von Andreas Gruntzig an einem 38 jährigen Mann durchgeführt (Gruntzig 1978). Aufgrund der stetigen Verbesserungen von Kathetern und bildgebenden Verfahren sowie der steigenden Erfahrung der Interventionalisten, sank das Auftreten akuter Komplikationen nach einer Angioplastie kontinuierlich ab. Dennoch entwickelten 30 bis 50 % der Patienten eine Wiederverengung (Restenose) innerhalb des behandelten Segments, was schließlich eine erneute Intervention notwendig machte (Bauters et al. 1996; Hirshfeld et al. 1991; Nobuyoshi et al. 1988).

Bei der Ballonangioplastie wird ein Führungsdraht über eine Schleuse, welche ein atraumatisches Einführen und Wechseln des Katheters ermöglicht, in das zu behandelnde Gefäß verbracht. Über ihn kann anschließend der Ballonkatheter in die Stenose vorgeschoben und platziert werden. Durch Inflation des Ballons wird der atherosklerotische Plaque komprimiert, gesunde Gefäßwandanteile überdehnt und so umschriebene Gefäßeinrisse in der Intima und der Media hervorgerufen (Winkhardt 2005).

Zu den häufigsten Komplikationen nach einer PCI zählt die erneute Wiederverengung des behandelten Gefäßabschnittes. Solch eine Restenose kann durch die elastischen Rückstellkräfte des Gefäßes, Thrombusbildung oder Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen hervorgerufen werden. Letzteres ist eine natürliche Reaktion des Gefäßes auf ein Trauma (Lapp und Krakau 2009; Waller 1989). Nach ihrer Proliferation beginnen die glatten Gefäßmuskelzellen durch Lücken der teilweise gerissenen inneren elastischen Membran (IEL internal elastic lamina) in die Intima zu migrieren und extrazelluläre Matrix zu bilden. Dies alles führt letztendlich zu einer Verdickung der Intima (=Intimahyperplasie

oder „Neointima“), deren Ausmaß unter anderem vom Grad der Verletzung abhängt. So zeigte sich in Gefäßen mit rupturierter IEL und fokal zerstörter Media eine signifikant stärkere Neointimabildung als bei Gefäßen mit intakter IEL und Media (Carter et al. 1999; Karas et al. 1992; Schwartz et al. 1992).

Entwickelt sich eine Restenose innerhalb eines implantierten Stents so spricht man auch von einer In-Stent-Restenose.

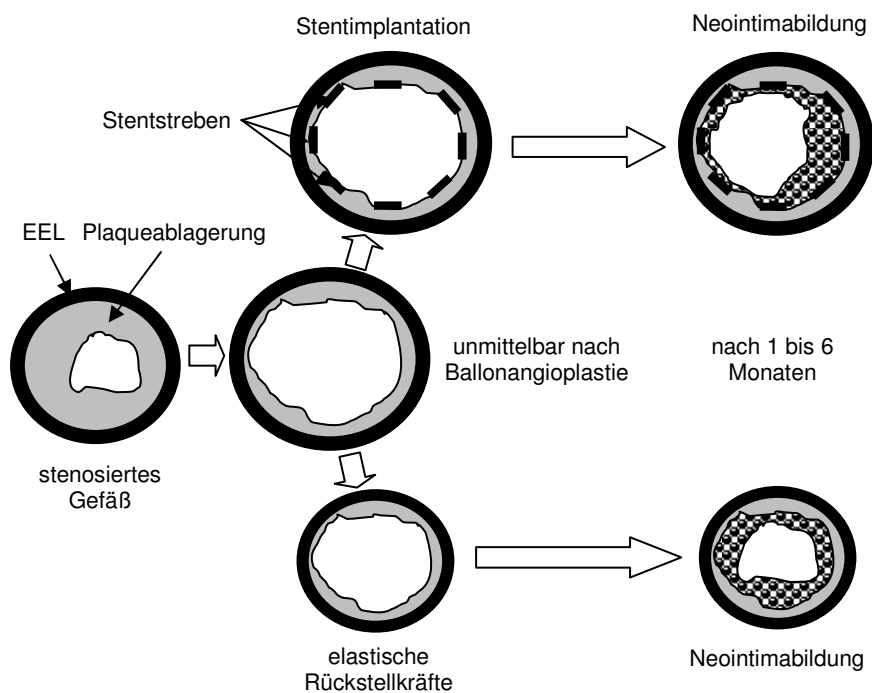


Abbildung 4: schematische Darstellung der Gefäßreaktion nach alleiniger Ballonangioplastie und Stentimplantation (modifiziert nach Rajagopal und Rockson 2003)

2.5.2 Stentimplantation

Bei Stents handelt es sich um endoluminale Gefäßprothesen, welche die Gefäßwand abstützen und dadurch ein dilatiertes Lumen erweitern (Eberli et al. 2001).

Neben der Erzielung eines größeren, glatten Gefäßlumens wirken sie zudem den elastischen Rückstellkräften des behandelten Gefäßes nach einer Ballonangioplastie entgegen.

Generell lassen sich zwei Arten von Stents unterscheiden. Die einfachen Bare-metal Stents (BMS) und die beschichteten Drug-eluting Stents (DES). Letztere sollen mit Hilfe eines aufgetragenen Medikaments die Intimahyperplasie und somit die Entwicklung einer In-Stent-Restenose verhindern (Holmes 2001; Lapp und Krakau 2009; Post et al. 1997).

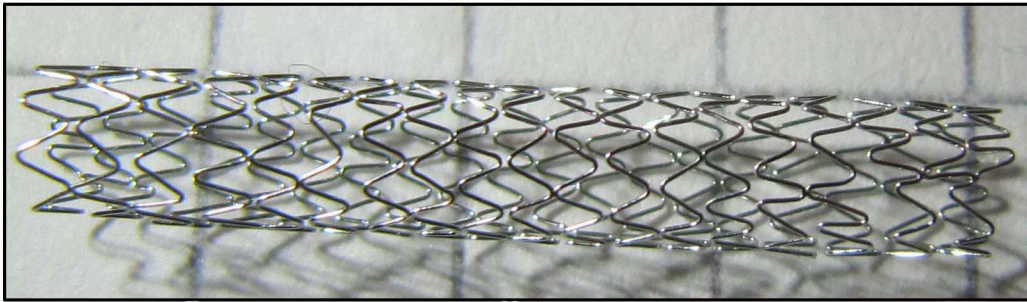


Abbildung 5: Photographie eines 20 mm langen, expandierten Stentgerüsts

Eindeutige Indikationen für eine Stentimplantation sind akute oder drohende Gefäßverschlüsse, Restenosen nach konventioneller PCI, Venen-bypassstenosen, Totalverschlüsse sowie ein akuter Myokardinfarkt (Eberli et al. 2001).

Der Gefäßzugang kann dabei über die A. femoralis, A. brachialis oder A. radialis erfolgen. Aufgrund ihrer Größe und der einfacheren Durchführbarkeit wird jedoch meist die A. femoralis bevorzugt (Bonzel und Hamm 2009).

Nach dem Legen einer Gefäßschleuse, wird der Führungsdraht unter ständiger Durchleuchtung in das Koronargefäß eingebracht und durch die Stenose vorgeschoben. Über den vorgelegten Draht kann nun ein Ballonkatheter bis in die Verengung vorgeführt und dilatiert werden (Steffel et al. 2011). Diese Vordilatation führt zu einer Reduktion des Stenosegrades und ermöglicht somit ein leichteres Vorschieben und Platzieren des Stents (Bonzel und Hamm 2009; Eberli et al. 2001). Danach wird der Ballonkatheter entfernt und stattdessen der Ballonkatheter mit dem Stent bis in die bereits dilatierte Stenose vorgeführt, positioniert und expandiert (Steffel et al. 2011).

Dabei können jedoch auch Komplikationen wie Gefäßperforationen durch einen zu groß gewählten Stentdurchmesser, Seitastokklusionen oder Infektionen auftreten (Eberli et al. 2001).

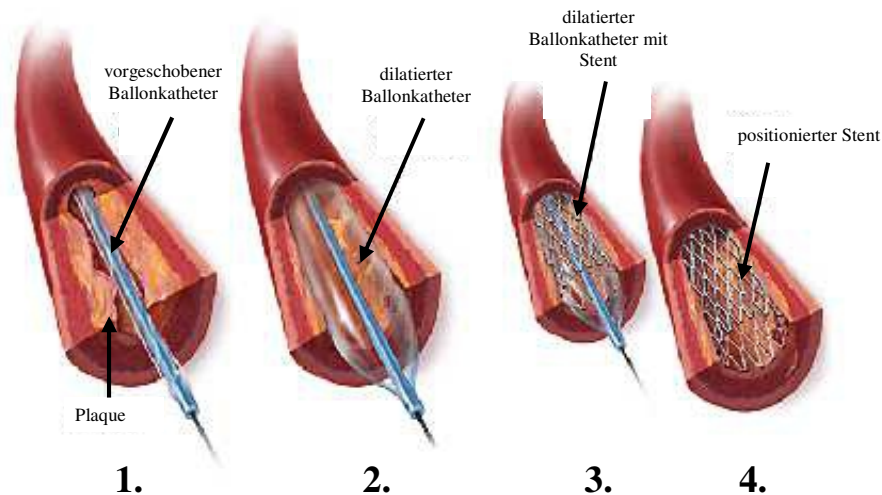


Abbildung 6: schematische Darstellung einer Stentimplantation (modifiziert nach Boston Scientific 2012)

1. Ballonkatheter wird in die Stenose vorgeschoben, 2. Vordilatation mittels Ballonkatheter, 3. ein zweiter Ballonkatheter wird in das vordilatierte Gefäß vorgeschoben und der aufgebrachte Stent entfaltet 4. Position des Stents nach Entfernung des Katheters

2.5.3 Medikamentöse Therapie

Aufgrund der heutigen Revaskularisierungsmöglichkeiten wie Ballonangioplastien und Stentimplantationen, spielt die alleinige medikamentöse Therapie der KHK eher eine untergeordnete Rolle, wohingegen die Prävention einen sehr wichtigen Stellenwert einnimmt (Besthorn und Roskamm 2004). In diesem Zusammenhang sind vor allem die Statine zu nennen. Durch die Hemmung der Hydroxymethylglutaryl-Co-Reduktase vermindern sie die Bildung von körpereigenem Cholesterin. Des Weiteren haben sie aufgrund ihrer antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften sowie ihrer Fähigkeit die Bioverfügbarkeit an vaskulärem NO zu erhöhen, einen schützenden Effekt auf das Gefäßendothel (Beubler 2011; Bonetti et al. 2003).

Im Gegensatz hierzu besitzen Medikamente, welche unterstützend zur Therapie der KHK eingesetzt werden, eine kardioprotektive Wirkung, indem sie die myokardiale Sauerstoffbilanz durch eine Verminderung des Sauerstoffbedarfs

bzw. durch eine Erhöhung des Sauerstoffangebots verbessern (Plötz 2007). Dazu zählen u.a. β -Blocker, ACE-Hemmern, Kalziumantagonisten und Nitrate.

Thrombozytenaggregationshemmer wie die Acetylsalicylsäure (Cyclooxygenasehemmer) und Clopidogrel (Adenosindiphosphat-Rezeptor-Antagonist) werden zum einen präventiv, aber auch nach interventionellen Eingriffen verabreicht (Balletshofer und Haasis 2006). Da sich das Thromboserisiko, vor allem nach der Implantation eines medikamentenbeschichteten Stents deutlich erhöht, ist eine duale antithrombozytäre Therapie, bestehend aus Acetylsalicylsäure und Clopidogrel, für jeden Patienten essentiell (Joner et al. 2006). Doch die längerfristige Anwendung dieser Medikamente birgt auch Risiken wie z.B. Blutungskomplikationen während und nach einer größeren Operation. Aufgrund der mangelnden Erkenntnisse über den genauen Einheilungsverlauf von Stentimplantaten, ist auch die optimale Zeitdauer dieser risikobehafteten dualen antithrombozytären Therapie bis heute unbekannt.

2.6 Stentsysteme und ihre klinische Bedeutung

Um das Problem der Wiederverengung des Gefäßes nach einer alleinigen Ballonangioplastie zu beheben, implantierte Sigwart 1986 den ersten Koronarstent in einen Menschen (Sigwart et al. 1987).

Trotz dieses Erfolges wurden sie in den darauf folgenden Jahren, aufgrund der hohen Rate an akuten Stentthrombosen, äußerst zurückhaltend eingesetzt. Dies änderte sich jedoch durch die Weiterentwicklung der Stentdesigns, der verbesserten Implantationstechnik sowie durch die Optimierung der begleitenden antithrombozytären Therapie. Heute werden nun über 90 % der koronaren Ballonangioplastien mit einer Stentimplantation abgeschlossen (Lapp und Krakau 2009).

Die ersten kommerziell vertriebenen Stents waren einfache Metallstents (BMS) aus rostfreiem Edelstahl. Im Vergleich zur Ballonangioplastie reduzierten sie die Restenosierung der behandelten Gefäße und machten somit die Notwendigkeit einer weiteren Intervention überflüssig (Fischman et al. 1994; Serruys et al. 1994). Doch auch trotz des Einsatzes von BMS lagen die In-Stent-Restenoseraten immer noch bei 22 % (Serruys et al. 1994), in komplexen Läsionen, kleinen Gefäßen

(<3,0 mm), bei Diabetes mellitus erkrankten Patienten oder mehreren implantierten Stents sogar bei über 50 % (Elezi et al. 1998; Kastrati et al. 1997).

Der Durchbruch in der Behandlung koronarer Gefäßerkrankungen kam mit der Einführung medikamentenbeschichteter Stents (Drug-eluting Stents = DES) im Jahre 2003 und mit der dadurch verbundenen Reduktion der In-Stent-Restenoserate auf unter 5 % (Colombo et al. 2003; Holmes et al. 2004).

Die DES der ersten Generation bestanden aus drei Komponenten. Dazu zählen 1. ein konventionelles Metallgerüst (Edelstahl), 2. mit einer Polymerbeschichtung, welche die Medikamentenabgabe dosiert und 3. ein immunsuppressives, antikoagulatives, antiinflammatorisches oder antiproliferatives Medikament (Lapp und Krakau 2009; Zilberman et al. 2010).

Im Gegensatz zu den antiproliferativen Substanzen haben antiinflammatorische und antikoagulative Medikamente jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und somit auf die Entstehung einer In-Stent-Restenose (Zilberman et al. 2010).

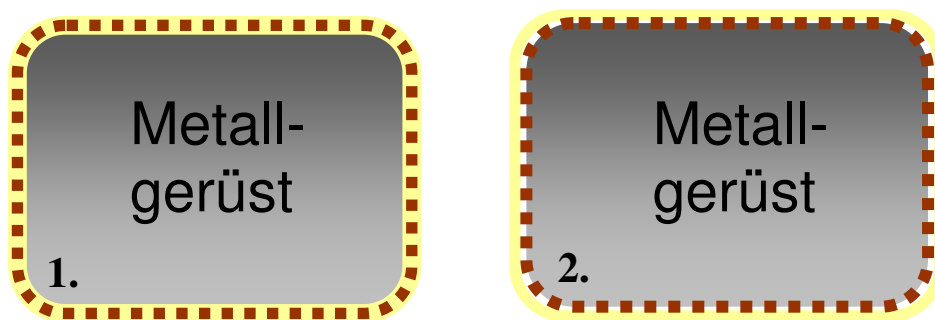


Abbildung 7: schematische Darstellung des Aufbaus medikamentenbeschichteter Stents (Querschnitt durch eine Strebe)

1. Medikament (■ ■ ■) ist im Polymer (■■■) integriert, 2. Medikament ist von Polymer bedeckt („Top Coat“)

Die ersten kommerziell erhältlichen Drug-eluting Stents waren der Sirolimus freisetzende CypherTM (Cordis) und der Paclitaxel freisetzende TaxusTM (Boston Scientific).

Diese medikamentenbeschichteten Stents hemmen zwar die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und wirken somit einer In-Stent-Restenose entgegen,

gleichzeitig kommt es durch sie aber auch zu einer verlangsamten Gefäßheilung. Diese äußert sich in Fibrinakkumulationen, einer vermehrten Einwanderung von Entzündungszellen (Lymphozyten, Makrophagen, Riesenzellen) in die Gefäßwand, einer verzögerten Re-Endothelialisierung und der damit verbundenen hohen Anzahl an freiliegenden Stentstreben (Joner et al. 2006; Poon et al. 1996; Wiskirchen et al. 2004). In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass die antiproliferativen Substanzen, welche eine überschießende Proliferation der glatten Gefäßmuskulzellen verhindern sollen, auch die Proliferation der Endothelzellen beeinträchtigen (Losordo et al. 2003). Hierzu haben Studien gezeigt, dass vor allem Paclitaxel und Rapamycin einen hemmenden Effekt auf die Re-Endothelialisierung besitzen (Farb et al. 2001; Guba et al. 2002).

Die deutlich verzögerte Gefäßheilung der Drug-eluting Stents stellt dabei einen bedeutenden Faktor bei der Entstehung einer späten Stentthrombose dar (Joner et al. 2006). Aus diesem Grund ist eine längere begleitende duale antithrombozytäre Medikamententherapie nach der Implantation eines Drug-eluting Stents essentiell (Joner et al. 2006; Lagerqvist et al. 2007). Sie sollte über mindestens ein Jahr gegeben werden, in bestimmten Fällen wie Implantation mehrerer Stents, Stents in Bifurkationen oder dem linken Hauptstamm auch darüber hinaus (Heller und Dangas 2010).

Des Weiteren zeigten Virmani et al. (2004), dass die Polymere dieser Stents bei empfindlichen Patienten massive Hypersensitivitätsreaktionen hervorrufen können, deren Erscheinungsformen vielfältig sind. Sie reichen von milden bis hin zu überschießenden eosinophilen Entzündungsreaktionen, die mit einer Zerstörung der Media, Malapposition von Stentstreben und Aneurysmenbildung einhergehen können.

Drug-eluting Stents der zweiten Generation wurden entwickelt, um die Nachteile der ersten Generation abzuschwächen bzw. zu umgehen. Durch die Einführung solch neuartiger Stentsysteme verfolgte man das Ziel, die Effektivität in der Reduktion der Intimahyperplasie beizubehalten und gleichzeitig die Sicherheit in der Verhinderung der Thromboseentstehung zu erhöhen.

Der Unterschied zu ihren Vorgängern lag dabei in 1. dünneren Streben und größerer Flexibilität durch neue Metallgerüste (Kobalt-Chrom, Kobalt-Nickel) (Daemen und Serruys 2007; Turco et al. 2007), 2. in weiterentwickelten

Polymeren (biodegradierbar oder biostabil) und 3. in den aufgetragenen Medikamenten (Everolimus, Zotarolimus, Sirolimus, Pimecrolimus, Biolimus (A9), Tacrolimus) (Zilberman et al. 2010).

Zu den am häufigsten implantierten Drug-eluting Stents der zweiten Generation zählen der Xience V[®] und der Endeavor[®] Resolute Stent.

Das Stentgerüst des Xience V[®] (Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA) besteht aus Kobalt-Chrom und ist mit einer dünnen Schicht (100 µg/cm²) des Medikaments Everolimus (Rapamycin-Derivat) in Verbindung mit einem biostabilen Polymer (= Fluoropolymer) beschichtet (Ruygrok et al. 2007).

Die Basis des Endeavor[®] Resolute Stents (Medtronic Inc., Santa Rosa, CA, USA) bildet der aus einer Kobaltlegierung bestehende Driver[®] Stent (Medtronic Inc., Santa Rosa, CA, USA). Auf ihn wird zusätzlich 160 µg/cm² des Medikaments Zotarolimus (Rapamycin-Derivat) sowie ein permanentes, biokompatibles Polymer (BioLinxTM) aufgebracht.

Neben der Verbesserung der Biokompatibilität sollen die neuartigen Polymere des Xience V[®] und Endeavor[®] Resolute auch zu einer Minimierung der Entzündungsreaktionen nach einer Stentimplantation beitragen (Gutiérrez-Chico et al. 2011).

2.7 Mechanismen der Stenteinheilung in atherosklerotisch veränderten Gefäßen des Menschen

Bei der Stenteinheilung handelt es sich um eine Wundheilung. Sie ist eine natürliche Reaktion des Gefäßes auf eine Verletzung und wird von verschiedenen chemotaktischen Faktoren, inflammatorischen Cytokinen, Wachstumsfaktoren und mitotischen Signalen kontrolliert, welche in erster Linie eine Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen hervorrufen (Virmani und Kolodgie 2011).

Zeitlicher Verlauf der Stenteinheilung nach einer Implantation:

- Die initiale Phase ist durch Thrombozytenaggregationen, Ablagerungen von Fibrin und durch Einwanderung von Entzündungszellen (Granulozyten und Makrophagen) in die Gefäßwand gekennzeichnet (Virmani und Kolodgie 2011).

- Nach 7 Tagen zeigen sich erste Ansammlungen glatter Gefäßmuskelzellen (GMZ) in einer proteoglykanreichen Extrazellulärmatrix (EZM) sowie vereinzelte Endothelzellen an der Grenze zum Lumen. Der genaue zeitliche Verlauf der Proliferation dieser glatter Gefäßmuskelzellen, welche für die Entstehung der In-Stent-Restenose verantwortlich sind, ist bis heute noch ungeklärt (Virmani und Kolodgie 2011).

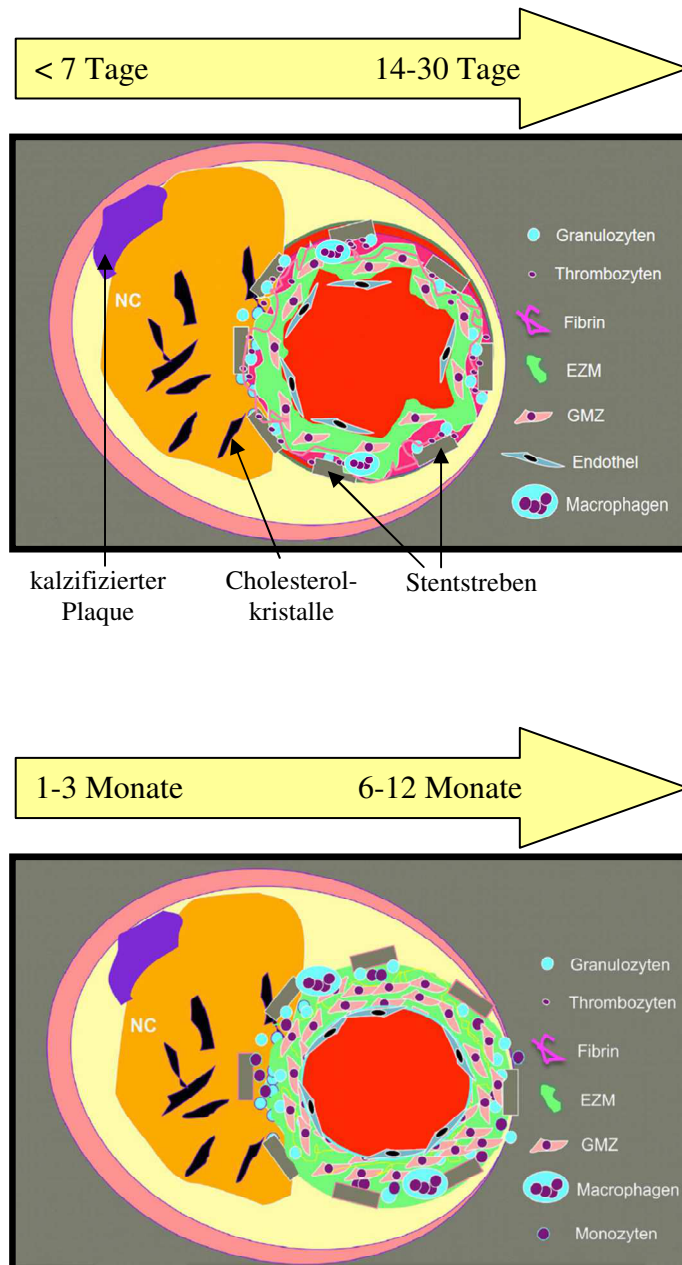


Abbildung 8: schematische Darstellung des Einheilungsverlaufes eines Stents in einem atherosklerotisch veränderten Gefäß (modifiziert nach Virmani et al. 2003)

- Die von glatten Gefäßmuskelzellen gebildete Extrazellulärmatrix der Neointima, welche initial aus Proteoglykanen und Kollagen Typ III besteht, wird innerhalb von 18 Monaten durch Kollagen Typ I ersetzt (Grewe et al. 2000; Virmani und Kolodgie 2011).
- Die Re-Endothelialisierung des Lumens ist nach ungefähr drei Monaten abgeschlossen (Farb et al. 1999; Grewe et al. 2000).

Der zeitliche Verlauf mit der eine Stenteinheilung von statten geht, ist von mehreren Faktoren abhängig:

- der Art des implantierten Stents (BMS, DES):
Durch die aufgetragenen Medikamente der Drug-eluting Stents kommt es, wie in 2.6 beschrieben, zu einer deutlich langsameren Gefäßheilung im Vergleich zu den Bare-metal Stents. Ebenso spielt die Polymerbeschichtung eine wichtige Rolle. Vor allem bei permanenten Polymeren kann es zu Hypersensitivitätsreaktionen mit übermäßiger Inflammation kommen, was den Heilungsverlauf negativ beeinflusst.
- dem Gesundheitszustand des Gefäßes:
Kommen die Stentstreben in einem atherosklerotisch veränderten Gefäß direkt über einem nekrotischen Kern (NC, necrotic core), kalzifiziertem oder fibrotischem Plaque zu liegen, weisen sie eine deutlich verzögerte Einheilung auf. Aufgrund des Mangels an glatten Gefäßmuskelzellen dieser Gewebe, müssen Zellen aus umliegenden Arealen „rekrutiert“ werden, um eine neointimale Schicht über den Streben bilden zu können. Dieser Vorgang dauert wesentlich länger als bei Streben, die direkten Kontakt zu gesundem intimalen Gewebe mit reichlich glatten Gefäßmuskelzellen aufweisen (Virmani und Kolodgie 2011).
- dem Schweregrad der Verletzung durch den implantierten Stent:
Das Ausmaß der Neointimabildung in gestenteten Gefäßen verläuft proportional zum Verletzungsgrad der Media. Kommt es bei der Implantation zu einer Penetration des nekrotischen Kerns (NC) durch einzelne Stentstreben, ist eine gesteigerte Entzündungsreaktion die Folge. Diese führt wiederum zu einer vermehrten Neointimabildung und somit zu einer stärkeren Restenosierung des Gefäßes (Farb et al. 2002).

2.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Aufgrund der Reduktion der In-Stent-Restenoserate durch den Einsatz medikamentenbeschichteter Stents (Drug-eluting Stents = DES), werden heutzutage vor allem diese in atherosklerotische Läsionen des Menschen implantiert. Über den Einheilungsverlauf ist aber bisher nur bekannt, dass er in solch pathologisch veränderten Gefäßen deutlich langsamer von statten geht als in gesunden. Des Weiteren bewirkt auch das aufgebraute Medikament dieser Stents eine stark verzögerte Gefäßheilung und führt dadurch zu einer zusätzlichen Steigerung des Thromboserisikos für den Patienten.

Im Moment gibt es jedoch noch keine Möglichkeit, den Fortschritt der Stenteinheilung im Menschen zuverlässig zu beurteilen. Folglich ist die notwendige Zeitdauer der risikobehafteten dualen antithrombozytären Medikamententherapie nach einer Implantation bis heute unbekannt.

Somit waren die Ziele dieser Arbeit:

- die Validierung der Optischen Kohärenztomographie (OCT) hinsichtlich der Beurteilung der Stenteinheilung durch einen Vergleich von histologischen Daten mit den entsprechenden präklinischen OCT Daten.
- die Gegenüberstellung der präklinischen (nach 28 und 42 Tagen) mit den klinischen OCT Daten nach 6 Monaten, um so den Fortschritt der Stenteinheilung der beiden DES mit der Situation im Menschen zu vergleichen.
- die Etablierung einer Graustufenmessung zur Gewebecharakterisierung mittels OCT. Diese Methode soll ermöglichen, die Gewebezusammensetzung und den Reifegrad von neu gebildetem Gewebe über dem implantierten Stent zu bestimmen, um damit die notwendige Dauer einer dualen antithrombozytären Therapie für jeden Patienten individuell anpassen zu können.
- eine zeitlich Abfolge der Einheilung aktueller DES im atherosklerotischen Tiermodell mittels Histologie und OCT zu definieren. Ein sekundäres Ziel war es, den Einheilungsverlauf dieser beiden medikamentenbeschichteten Stents untereinander sowie zum unbeschichteten Bare-metal Stent zu charakterisieren.

3. Material und Methoden

3.1 Tiermodell

3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten 25 männliche New Zealand White (NZW) Kaninchen (Charles River Laboratories GmbH, Kisslegg, Deutschland). Zu Versuchsbeginn waren die Tiere 24 Wochen alt und wogen zwischen 3,8 und 4,0 kg. Die Haltung erfolgte in Einzelkäfigen in einem klimatisierten Raum mit künstlicher Beleuchtung und einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus. Während der gesamten Versuchsdauer konnten die Tiere das pelletierte Futter und Wasser ad libitum zu sich nehmen. Zudem erhielten sie täglich eine Handvoll Heu sowie Saftfutter. Es erfolgte eine tägliche Kontrolle und eine Protokollierung des Gesundheitszustandes der Tiere. Der Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde von der Regierung von Oberbayern unter der Versuchsnummer AZ 55.2-1-54-2531-29-10 genehmigt.

Von den 25 Kaninchen wurden drei Tiere aus dem Versuch herausgenommen, da sie eine Belastung widerfahren hatten, die einen sofortigen Abbruch gemäß den Vorgaben aus dem TV-Antrag notwendig machte. Alle weiteren 22 Tiere überlebten die Prozedur und zeigten sich bei gutem Allgemeinbefinden ohne erkennbare Beeinträchtigungen.

3.1.2 Stentauswahl und Gruppeneinteilung

Für diese Studie wurden den Kaninchen medikamentenbeschichtete Drug-eluting Stents implantiert, die auch routinemäßig im Menschen zum Einsatz kommen. Dabei handelte es sich um den Xience V[®] (Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA) und den Endeavor[®] Resolute Stent (Medtronic Inc., Santa Rosa, CA, USA) mit permanentem Polymer. Als Kontrolle, inwieweit die aufgetragenen Medikamente der DES den Einheilungsverlauf beeinflussen, diente der unbeschichtete Driver[®] Stent (Medtronic Inc., Santa Rosa, CA, USA).

In Abhängigkeit vom Gefäßdurchmesser der jeweiligen Arteria iliaca externa wurden bei vier Tieren der 28-Tages-Gruppe ein 3,0 x 12 mm Stents implantiert (vier Endeavor[®] Resolute und vier Driver[®]). Alle anderen Tiere erhielten 2,5 x 12 mm Stents.

18 Kaninchen wurden aufgrund der Versuchsdauer von 28 und 42 Tagen in zwei Gruppen unterteilt. Je Gruppe erhielten die Tiere abwechselnd insgesamt sechs Xience V[®] und sechs Endeavor[®] Resolute Stents. Als Kontrolle dienten je Zeitpunkt sechs Driver[®] Stents.

Weiteren vier Tieren wurde zur Beurteilung der Endothelialisierung durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen (REM) nach 28 Tagen, drei Xience V[®] und drei Endeavor[®] Resolute Stents implantiert. Auch hier dienten zwei Driver[®] Stents als Kontrolle.

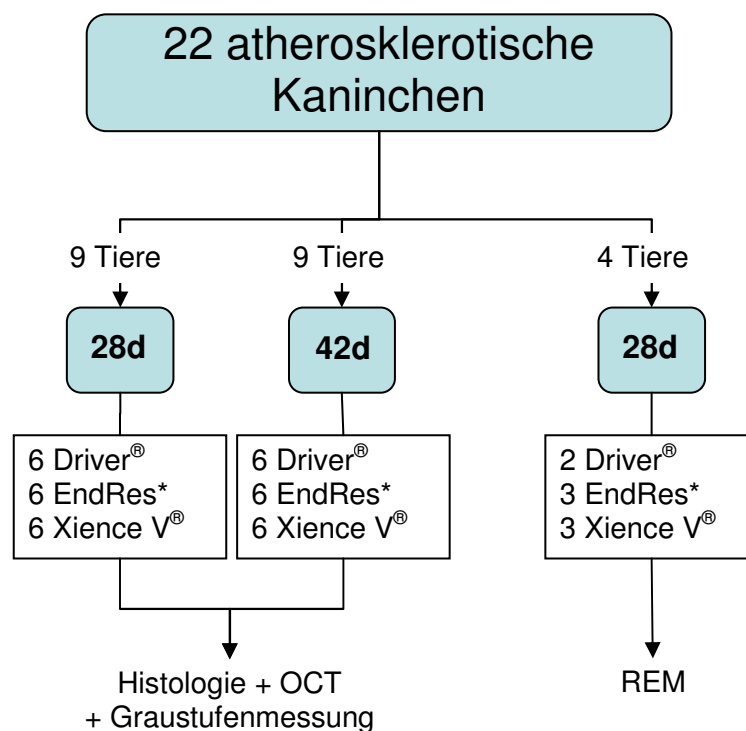


Abbildung 9: Fließdiagramm des Versuchablaufes

* EndRes = Endeavor[®] Resolute Stent

3.1.3 Fütterung einer cholesterinreichen Diät

Nach einer zweiwöchigen Eingewöhnungsphase mit Standardfutter (2120, Altromin, Lage, Deutschland) erhielten die Tiere spezielles 1 %-iges Cholesterinfutter (1 % Cholesterin + 6 % Erdnussöl, 2023 mod., Altromin, Lage, Deutschland). Nach fünf Wochen wurde den Tieren eine 0,025 %-ige Cholesterindiät (0,025 % Cholesterin + 6 % Erdnussöl, 2023 mod., Altromin, Lage, Deutschland) angeboten.

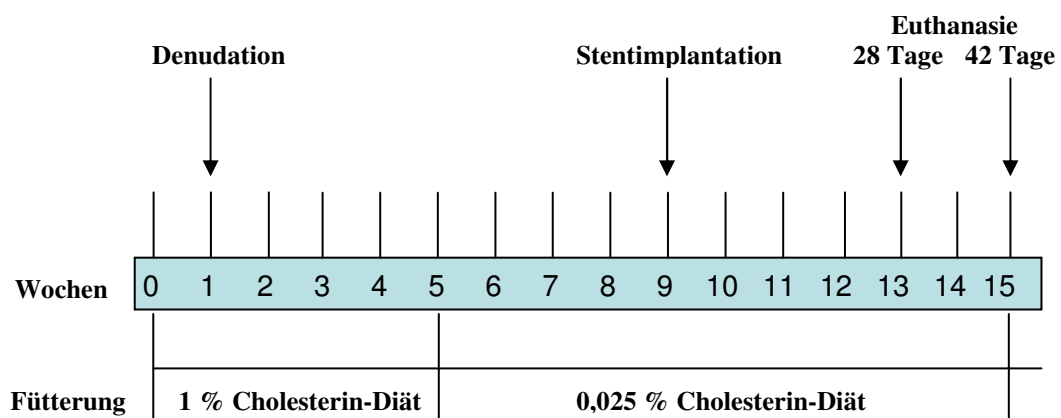


Abbildung 10: Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs mit Euthanasie der Tiere 28 bzw. 42 Tage nach Stentimplantation

3.2 Arterielle Denudation

Eine Woche nach Beginn der Anfütterung mit 1 %-iger Cholesterindiät erfolgte bei den Tieren beider Versuchsgruppen eine beidseitige katheterbasierte Verletzung (Denudation) der Arteria iliaca externa.

Zur Schmerzprävention erhielten sie präoperativ 0,025 mg/kg KGW Buprenorphin (Temgesic[®], Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) s.c. Die Narkoseeinleitung erfolgte über einen Ohrvenenkatheter mit einem Bolus von 1 %-igem Propofol („Fresenius“ Kabi, Bad Homburg, Deutschland). Anschließend wurden die Tiere intubiert, beatmet und die Narkose mittels eines 2 %-igen Propofol-Perfusors (100 mg/kg/h) aufrechterhalten. Die chirurgische Toleranz und Analgesie konnte durch eine zusätzliche, kontrollierte Gabe von 0,01 mg/kg KGW Fentanyl (DeltaSelect, Dreieich, Deutschland) erreicht werden. Nach Überprüfung der völligen Schmerzfreiheit anhand des Zwischenzehenreflexes wurde eine ca. 2 cm lange Inzision im linken Halsbereich gesetzt, die oberflächlichen Halsmuskeln und Faszien stumpf präpariert und die tiefe Halsmuskulatur dargestellt. Anschließend erfolgte die Durchtrennung der Faszie der tiefen Halsmuskulatur linksseitig der Trachea und die Präparation der Arteria carotis communis. Diese wurde vom umgebenden Nervus vagus getrennt und schließlich am proximalen und distalen präparierten Ende angeschlungen. Die Arteria carotis communis wurde nun mittels einer Mikrodissektionsschere inzidiert und eine 5 French Gefäßschleuse (Radiofocus[®] Introducer II, TERUMO[®], Tokyo, Japan) eingebracht. Über diese konnte ein 4 French Swan-Ganz-Katheter (ARROW[®] Balloon Wedge Pressure Catheter, Arrow International, Reading, USA) eingeführt und unter Durchleuchtung über den Aortenbogen bis in die Aorta abdominalis, kurz vor der Aufzweigung der Arteria iliaca communis, gelegt werden. Nach Anfertigung eines initialen Angiogramms mit 1:1 verdünntem Kontrastmittel (Imeron[®], Bracco Imaging, Konstanz, Deutschland) wurde die Schleuse vorsichtig über den Aortenbogen geschoben. Der als Führung dienende Swan-Ganz-Katheter konnte danach entfernt und ein 3 French Fogarty[®]-Katheter (Edwards Lifesciences[™], Irvine, USA) in das distale Ende der Arteria iliaca externa platziert werden. Zur Denudation des Gefäßes wurde der Katheterballon mit ca. 0,1 ml Kontrastmittel gefüllt und zweimal bis zur Bifurkation zurückgezogen.

Anschließend wurde diese Prozedur in der kontralateralen Arteria iliaca externa wiederholt und ein Angiogramm zum Ausschluss einer Gefäßdissektion angefertigt.

Nach Entfernung der Schleuse erfolgte eine permanente Ligatur der linken Arteria carotis communis sowie ein zweischichtiges Vernähen der Wunde.

Eine Antikoagulation wurde durch die intraoperative Gabe von 150 IE/kg Heparin (Heparin-Natrium-25000, Merckle GmbH, Blaubeuren, Deutschland) und 40 mg Aspirin i.v. (Aspirin i.v., Bayer Schering Pharma AG, Leverkusen, Deutschland) erreicht. Postoperativ erhielten die Tiere einmalig Buprenorphin (0,025 mg/kg KGW) s.c.

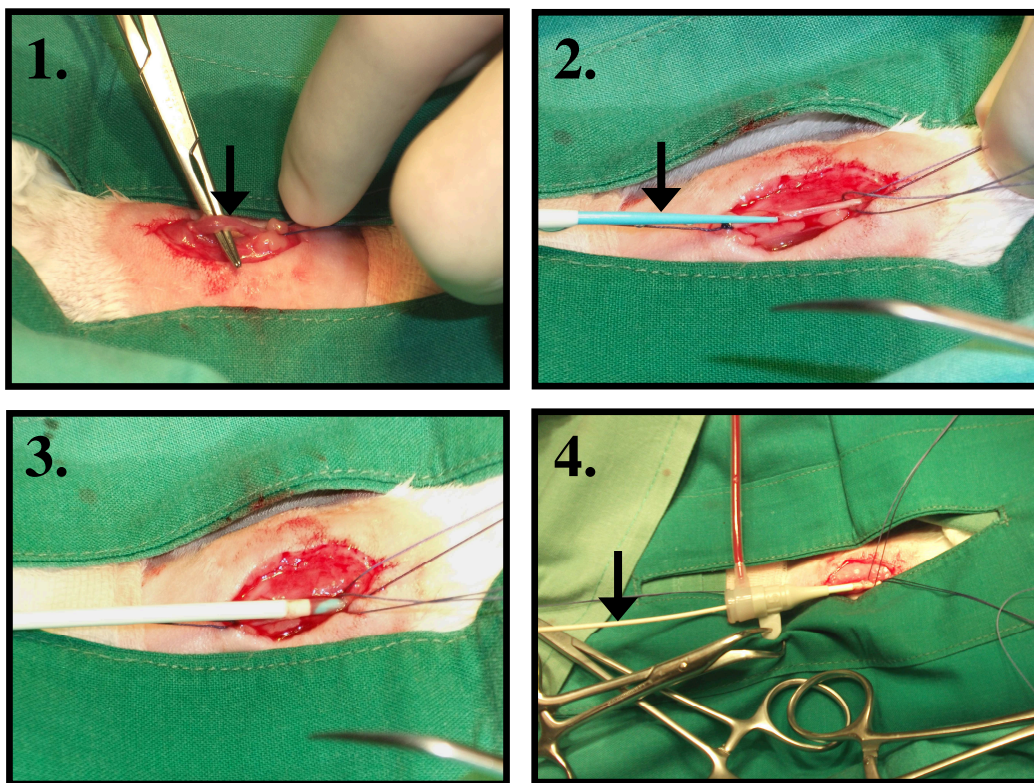


Abbildung 11: Legen der Gefäßschleuse in die Arteria carotis communis als Vorbereitung zur Denudation

1. Präparation der Arteria carotis communis (Pfeil), 2. nach dem Anschlingen und der Inzision der Arterie wird die Gefäßschleuse (Pfeil) eingeföhrt, 3. Vorschieben der Gefäßschleuse, 4. Fixierung der Schleuse mit einer Backhausklemme und Einföhrung des Swan-Ganz-Katheters (Pfeil)

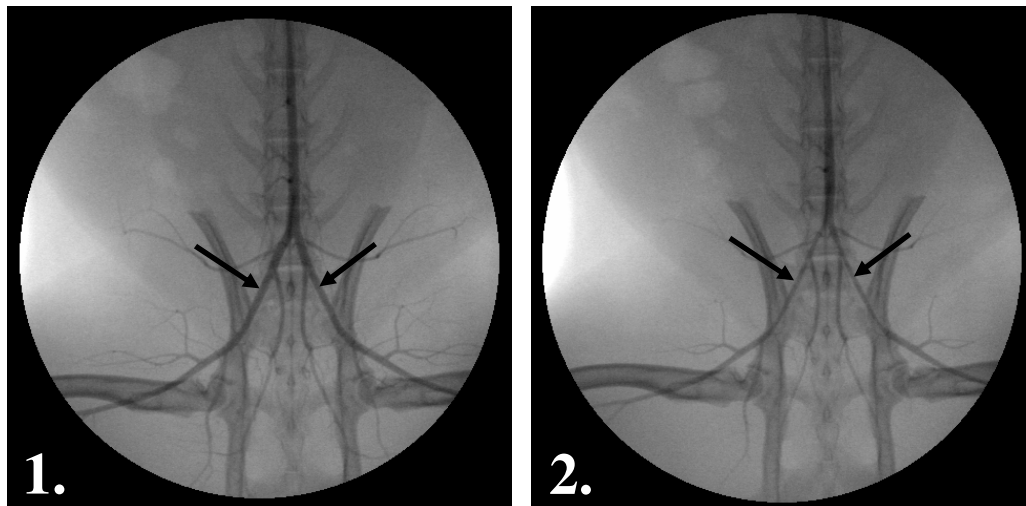


Abbildung 12: angiographische Aufnahmen zur Darstellung beider externer Iliakalarterien (Pfeile)

1. vor Denudation weisen die Gefäße einen physiologischen Durchmesser auf
2. nach der Denudation ist der Gefäßdurchmesser beider Arterien aufgrund von Spasmen deutlich verringert

3.3 Stentimplantation

Die Prämedikation, Narkoseeinleitung sowie –aufrechterhaltung erfolgte wie schon bei der Denudation. Unter der gleichen Operationsmethode wurde nun der Gefäßzugang über die rechte Arteria carotis communis gelegt. Nach Einführung des Swan-Ganz-Katheters und Anfertigung eines Angiogramms zur Lokalisierung der atherosklerotischen Gefäßveränderungen beider Iliakalarterien, erfolgte das Vorlegen des Führungsdrahtes. Über diesen wurden nun die Stents in den veränderten Bereichen platziert und durch Kontrastmittelinflation (8-9 atm) für 30 Sekunden aufgedehnt. Zum Ausschluss einer Gefäßdissektion oder eines Aneurysmas wurde ein erneutes Angiogramm angefertigt.

Nach Entfernung der Schleuse erfolgte eine permanente Ligatur der rechten Arteria carotis communis sowie eine zweischichtige Naht der Wunde. Postoperativ erhielten die Tiere einmalig Buprenorphin (0,025 mg/kg KGW) s.c.

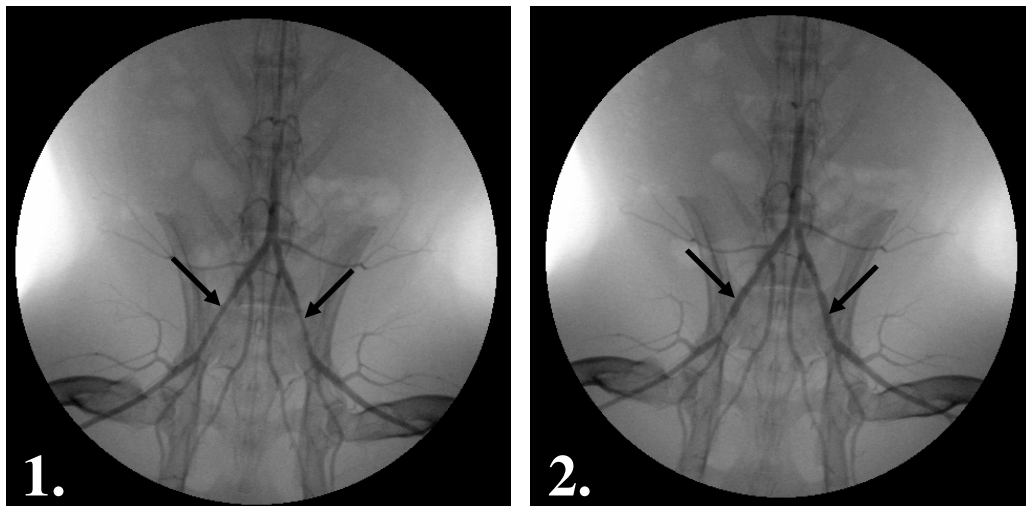


Abbildung 13: angiographische Darstellung beider externer Iliakalarterien vor (1.) und nach (2.) Stentimplantation

1. atherosklerotische Stenosierung (Pfeile)
2. deutliche Lumenerweiterung nach Stentimplantation (Pfeile)

3.4 Blutentnahmen und antithrombozytäre Therapie

Zur Bestimmung der Blutparameter wurde den Tieren zum Zeitpunkt der Futterumstellung auf 0,025 % Cholesterindiät, während der Denudation, der Stentimplantation und unmittelbar vor der Euthanasie jeweils 2 ml venöses Blut aus der Vena auricularis lateralis bzw. direkt aus der gelegten Schleuse entnommen. Sofort nach der Entnahme wurden die Proben zu je 1 ml in Serumröhrchen gekühlt gelagert und noch am selben Tag zur Analyse der Gallensäuren zu Idexx (Vet Med Labor GmbH, Ludwigsburg, Deutschland) versendet sowie zur Bestimmung des Cholesteringehalts in das Hämatologielabor des Deutschen Herzzentrums, München verbracht.

Um eine Thrombenbildung zu vermeiden, erhielten die Tiere während der ersten 14 Tage nach der Denudation und ab dem Zeitpunkt der Stentimplantation bis zum Versuchsende, täglich 40 mg Aspirin (Aspirin Migräne, 500 mg, Bayer Schering Pharma AG, Leverkusen, Deutschland) per os.

3.5 Versuchsende

Je nach Versuchsgruppe erfolgte die Gefäßentnahme 28 bzw. 42 Tage nach Stentimplantation. Hierfür wurden die Tiere mit der oben beschriebenen Prämedikation und Narkosetechnik narkotisiert und das Abdomen nach Erreichen der chirurgischen Toleranz entlang der Linea alba eröffnet. Nach Vorverlagerung des Darmkonvolutes erfolgte die Präparation der Aorta abdominalis sowie der Vena cava caudalis. Beide Gefäße wurden nun kranial ligiert und distal der Ligatur inzidiert, um so eine 6 French Gefäßschleuse nach kaudal einbringen zu können. Nach Anfertigung eines Angiogramms erfolgte die Euthanasie der Kaninchen mit 300 mg/kg KGW Pentobarbital-Natrium (Narcoren[®], Merial, Hallbergmoos, Deutschland). Anschließend wurden die Gefäße mit ca. 500 ml heparinisierter Ringer Infusionslösung gespült und in situ per Optischer Kohärenztomographie (OCT) untersucht.

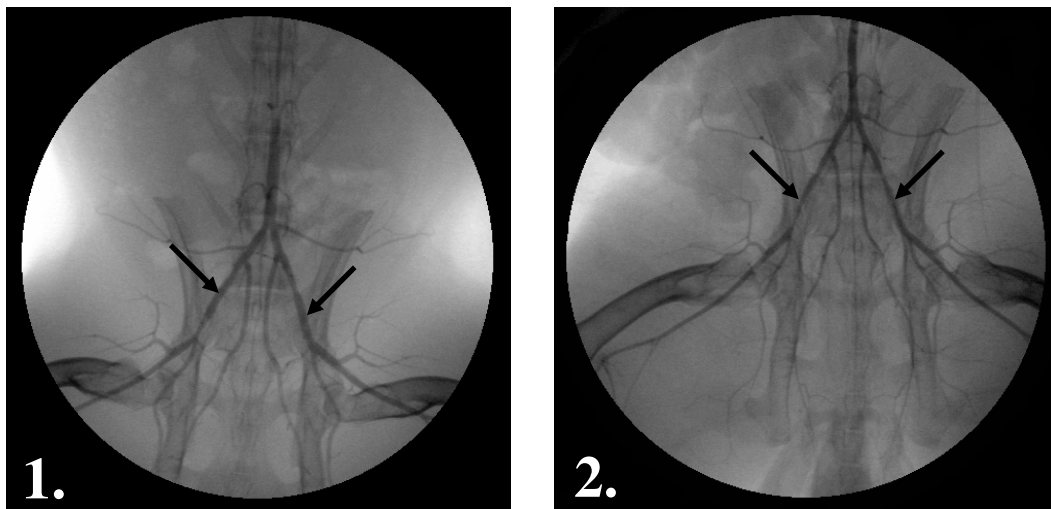


Abbildung 14: angiographische Darstellung beider externer Iliakalarterien (Pfeile) direkt nach Stentimplantation (1.) und zum Zeitpunkt der Euthanasie (2.)

1. Lumenerweiterung durch Stentimplantate, 2. erneute Restenosierung beider Gefäße (mittelgradig bis hochgradig)

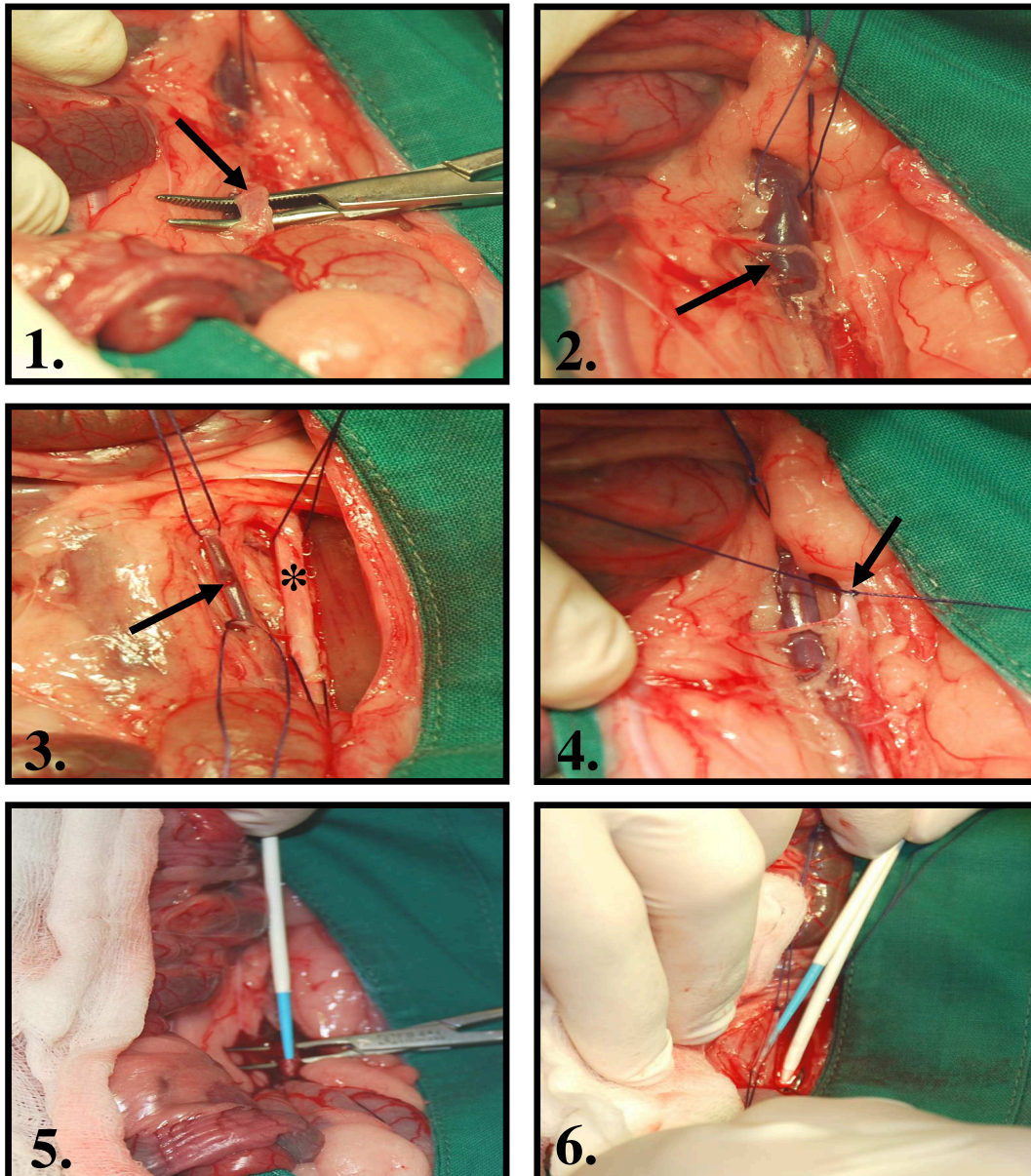


Abbildung 15: Vorbereitungen für die OCT Untersuchung zum Versuchsende
1. Präparation der Aorta abdominalis (Pfeil), 2. Präparation und Anschlingen der Vena cava caudalis (Pfeil), 3. Angeschlungene Aorta abdominalis (*) und Vena cava caudalis (Pfeil), 4. Ligatur der Aorta abdominalis (Pfeil), 5. Schieben der ersten Gefäßschleuse in die Aorta abdominalis, 6. Schieben der zweiten Gefäßschleuse in die Vena cava caudalis

3.6 Untersuchung der Gefäße mittels Optischer Kohärenztomographie

Bei dem verwendeten OCT Gerät handelte es sich um das nicht-okklusive C7-XR™ - System (LightLab Imaging Inc., Westford MA, USA) mit einer automatischen Rückzugsgeschwindigkeit von 20 mm/s und einer axialen Auflösung von 20 μm . Mit Hilfe eines Führungsdrahtes wurde der OCT-C7 Dragonfly™ Katheter (LightLab Imaging Inc., Westford MA, USA) erst in die linke, später in die rechte Arteria iliaca externa vorgeschoben und 1 cm distal des implantierten Stents platziert. Die OCT Untersuchung erfolgte dann unter Spülung mit 20 ml (10 ml/s) heparinisierten Ringer Infusionslösung. Da das Gerät alle 0,2 mm ein Bild (Frame) generierte, konnten von einem 12 mm langem Stent insgesamt 60 Frames gewonnen werden.

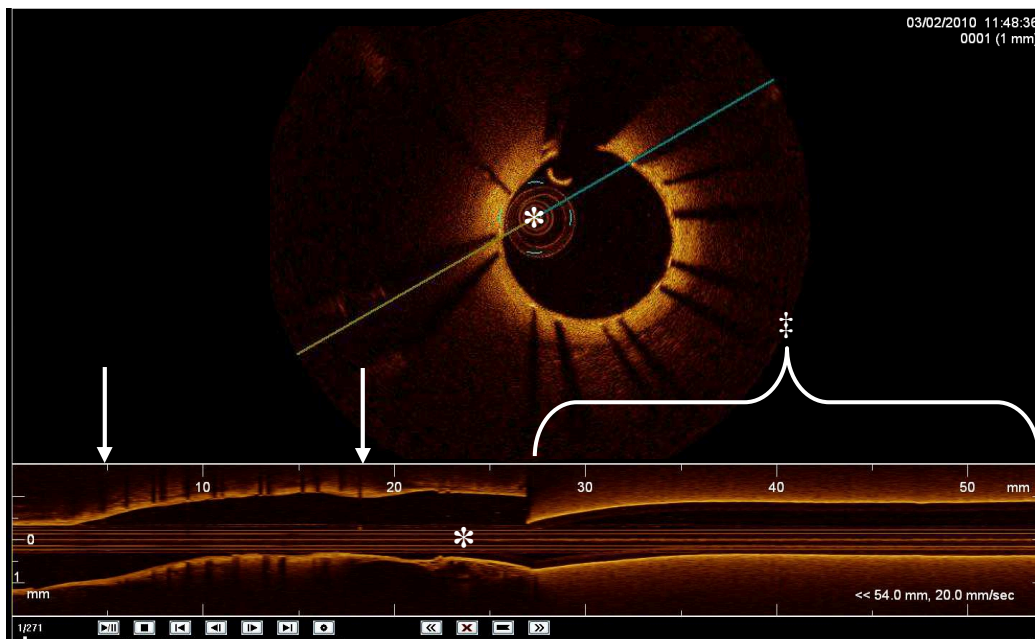


Abbildung 16: Darstellung eines gestenteten Gefäßes als Querschnitt = Frame (obere Abb.) und als Längsschnitt (untere Abb.) während der OCT Untersuchung Pfeile markieren das distale und proximale Ende des Stents

* = OCT Katheter

⊞ = Gefäßschleuse

3.7 Gefäßentnahme und Fixierung der gestenteten Gefäßsegmente

Im Anschluss an die OCT Untersuchung wurden die gestenteten Gefäße in situ mit 10 %-igem gepuffertem Formaldehyd fixiert und freipräpariert. Die Explantation erfolgte ca. 0,5 cm proximal sowie unmittelbar distal der gestenteten Gefäßabschnitte. Anschließend wurden die entnommenen Segmente vorsichtig vom umgebenen Gewebe befreit, mit 4 %-igem gepuffertem Formaldehyd gespült und bis zur weiteren histologischen Aufarbeitung in 4 %-igem gepuffertem Formaldehyd fixiert.

3.8 Histologische Aufbereitung der Proben

3.8.1 Methylmetacrylat – Einbettung

Um zu verhindern, dass die Stents während des Zuschneidens zerbrechen, wurden sie zuvor in Methylmethacrylat (MMA) eingebettet. MMA besitzt den Vorteil schnell zu polymerisieren und durch seine Festigkeit, im Gegensatz zu Paraffin, den Stent während des Schneidens sicher zu fixieren.

Zur Einbettung wurde das MMA-Einbettprotokoll nach Milz und Putz (1994) verwendet.

Tabelle 1: MMA-Einbettprotokoll nach Milz und Putz (1994)

1. Entwässerungsreihe für Stentproben

| | |
|-------------------------------|--------|
| 4 % gepuffertes Formaldehyd | 1 Tag |
| 100 % Ethanol | 1 Tag |
| Aceton | 1 Tag |
| Aceton + 100 % Methanol (1:1) | 1 Tag |
| 100 % Methanol | 3 Tage |

2. Einbettung

| | |
|----------------------------|--------|
| MMA + 100 % Methanol (1:1) | 3 Tage |
| 1. Wechsel MMA | 3 Tage |
| 2. Wechsel MMA | 3 Tage |

3. Polymerisation

Da MMA die Eigenschaft besitzt Plastik zu zersetzen ist es wichtig, die Proben in Glasbehältnissen aufzubewahren. Nach dem zweiten MMA-Wechsel wurden die Proben in einem stets frisch angesetztem MMA-Polymerisationsgemisch eingebettet. Unmittelbar danach wurden sie in einen Dessikator verbracht und mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Laboport; KNF Neuberger; Freiburg, Deutschland) für 10 Minuten unter Vakuum gesetzt. Anschließend erfolgte die Aushärtung der Proben für 3 - 4 Tage in einem Wärmeschrank (37 °C).

3.8.2 Anfertigung von histologischen Schnitten

Nach Aushärtung des Methylmetacrylats wurden die Glasformen zerschlagen, die Proben mit Hilfe einer Bandsäge (metabo BAS317 Precision; Metabowerke GmbH, Nürtingen, Deutschland) in rechteckige Blöcke (Kantenlänge ca. 1 cm x 3 cm) gesägt und anschließend mit Cyanolit[®] Kleber (Typ 201, Bürklin, Oberhaching, Deutschland) auf einer Rundhalterung fixiert.

Die Anfertigung der 5 µm dünnen Schnittpräparate pro Schnittebene erfolgte unter Verwendung eines Groß- und Hartschnittmikrotoms (SM2500, Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland) in Verbindung mit einem speziellem Hartmetallmesser (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Der Abstand zwischen den einzelnen Schnittebenen betrug 1000 µm und wurde mit Hilfe einer Innenlochsäge (Sägemikrotom SP1600, Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland) bewerkstelligt. Pro Stent wurden insgesamt 9 Schnitte angefertigt, die gleichförmig über die Länge des Stent verteilt waren.

Nachdem die Schnitte auf Objektträger (Superfrost[®] Plus, Thermo Scientific, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) aufgebracht, mit 70 %-igem Ethanol geglättet und mit selbst hergestelltem Haupt's Adhäsions Reagenz fixiert

wurden, erfolgte die Trocknung der Proben bei 60 C° für 24 Stunden im Wärmeschrank.

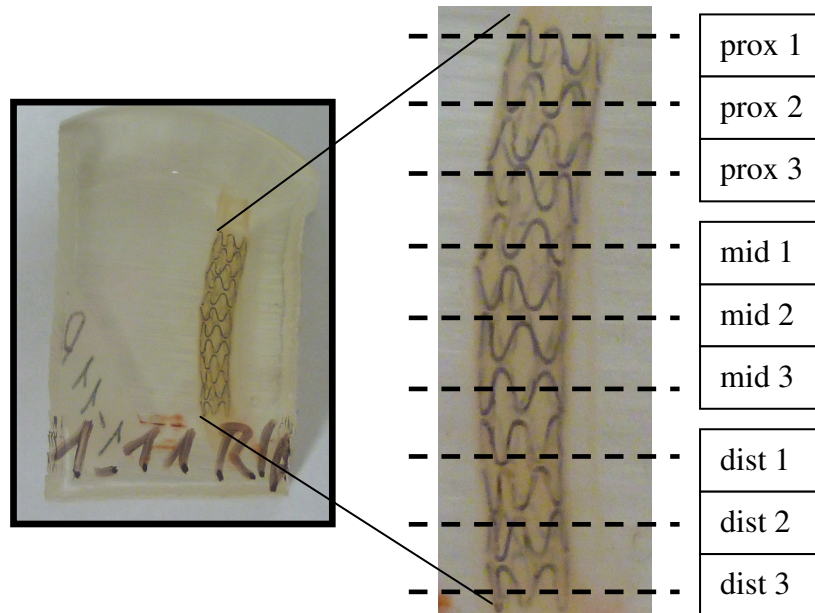


Abbildung 17: ein in MMA eingebettetes gestentetes Gefäß mit den neun Schnittebenen (proximal 1-3; mid 1-3; distal 1-3)

3.8.3 Modifizierte Movat-Pentachrom-Färbung

Um die Proben bezüglich ihrer morphometrischen Parameter auswerten zu können, wurde jeweils ein Schnitt pro Ebene nach der modifizierten Movat-Pentachrom-Färbung angefärbt. Die Durchführung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Tabelle 2: Movat-Pentachrom Färbeprotokoll

1. Entplastinieren und Rehydrieren

| | |
|--|-------------------------------|
| Xylol | über Nacht bei Raumtemperatur |
| 2 - Methoxyethylacetat | 30 min. |
| 100 % Ethanol | 2x 10 min. |
| 96 % Ethanol | 2x 10 min. |
| 70 % Ethanol + 1 % HCL | 10x dippen |
| Waschen in warmen Leitungswasser (36 °C) | 3x |

2. Färbung

| | |
|--|------------|
| Alcian Blau* | 30 min. |
| Waschen in heißem Leitungswasser (70 °C) | 3x |
| Working Hematoxylin-Lösung* | 20 min. |
| Waschen in warmen Leitungswasser (36 °C) | 3x |
| 2 % FeCl ₃ * | 30 sek. |
| Waschen in warmen Leitungswasser (36 °C) | 3x |
| 5 % Natriumthiosulfat* | 1 min. |
| Waschen unter laufendem Leitungswasser | 1,5 min. |
| Spülen in Aqua dest. | 1x |
| Woodstain Scarlet Working Solution* | 20 min. |
| Waschen in Aqua dest. | 5x dippen |
| 0,5 % Essigsäure* | 10x dippen |
| 5 % Phosphowolframsäure* | 5 min. |
| Waschen in Aqua dest. | 2x dippen |
| 0,5 % Essigsäure* | 8 sek. |
| Schnitte abtropfen lassen | |
| 96 % Ethanol | 1 min. |
| 100 % Ethanol | 1 min. |
| 100 % Ethanol | 1 min. |
| Alkoholische Safran-Lösung* | 25 min. |

3. Dehydrieren

| | |
|------------------|--------------------|
| 2x 100 % Ethanol | jeweils 15x dippen |
| 2x Xylol | jeweils 15x dippen |

* Lösungen wurden selbst hergestellt

3.8.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Beurteilung der Einheilungsparameter wurde pro Schnittebene jeweils ein histologisches Präparat mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) angefärbt.

Tabelle 3: H&E Färbeprotokoll

1. Entplastinieren und Rehydrieren

| | |
|--|-------------------------------|
| Xylol | über Nacht bei Raumtemperatur |
| 2 - Methoxyethylacetat | 30 min. |
| 100 % Ethanol | 2x 10 min. |
| 96 % Ethanol | 2x 10 min. |
| 70 % Ethanol + 1 % HCL | 10x dippen |
| Waschen in warmen Leitungswasser (36 °C) | 3x |

2. Färbung

| | |
|--|------------|
| Mayers Hematoxylin | 36 min. |
| Waschen in heißem Leitungswasser (70 °C) | 3x |
| Ammoniumwasser* | 15x dippen |
| Waschen in warmen Leitungswasser (36 °C) | 4x |
| Eosin Y/Phloxine B Working Solution* | 3 min. |

3. Dehydrieren

| | |
|------------------|--------------------|
| 2 x 96 % Ethanol | jeweils 15x dippen |
| 2 x 100 % EtOH | jeweils 15x dippen |
| 2 x Xylol | jeweils 15x dippen |

* Lösungen wurden selbst hergestellt

Zum Schluss wurden alle Proben mit Eukitt[®] (quick-hardening mounting medium, FLUKA, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) eingedeckt und zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

3.9 Histopathologische Auswertung

Für die morphometrische Auswertung (Abb. 18) wurden alle Movat-Pentachrom gefärbten Schnitt-Präparate zuerst mit Hilfe eines Mikroskops mit integrierter Kamera (BX41, Olympus, Hamburg, Deutschland) abphotographiert und anschließend mit dem Cell^F-Programm (Cell^F Software, Olympus, Hamburg, Deutschland) vermessen.

Die Messung der **Lumenfläche** erfolgte, indem eine Linie (—) entlang der Grenze zwischen Lumen und Gefäßwand gezogen wurde. Auf diese Art wurde auch die **Fläche innerhalb der Lamina elastica externa** (EEL) ermittelt (—). Aufgrund der teilweise rupturierten Lamina elastica interna (IEL), konnte die **Fläche innerhalb der IEL** nicht immer eindeutig identifiziert und nachverfolgt werden. Somit wurde, bei fehlender IEL, eine gerade Linie zwischen den Außenkonturen der Stentstreben gezogen (—). Als nächstes konnte durch die Verbindung der Innenkonturen der einzelnen Stentstreben die **Stentfläche** (—) ermittelt werden.

Mit Hilfe dieser gemessenen Parameter wurde nun die **Neointimafläche** (Fläche der IEL - Lumenfläche) sowie die **prozentuale Stenose** [(Neointimafläche/Fläche der IEL)*100 %] berechnet.

Für die Messung der mittleren **Neointimadicke über den einzelnen Stentstreben** (weiße Pfeile) wurde der Abstand zwischen der Lumengrenze und der luminal gerichteten Strebenseite bestimmt. Zusätzlich konnte durch die Messung der Abstände von der IEL (bzw. Linie zwischen den Außenkonturen der Streben) zur Lumengrenze zwischen den einzelnen Streben, die **mittlere Neointimadicke zwischen den Streben** (schwarze Pfeile) ermittelt werden. Aus den Werten der beiden letztgenannten Parametern errechnete sich dann die **mittlere Gesamtneointimadicke** mit der Formel: [(mittlere Neointimadicke über den Streben + mittlere Gesamtneointimadicke zwischen den Streben)/2].

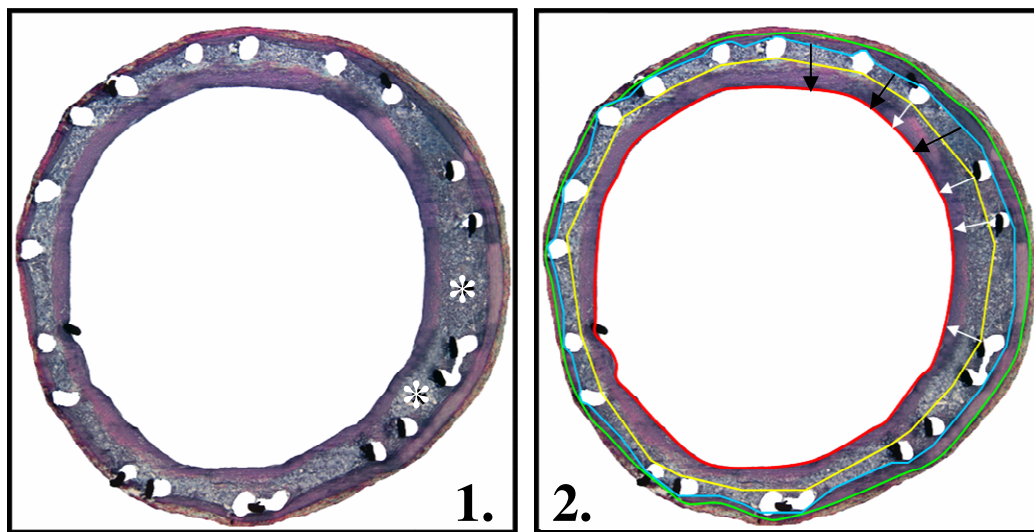


Abbildung 18: Movat-Pentachrom gefärbte histologische Schnittpräparate

1. natives Präparat (* = Plaqueablagerungen); 2. mit eingezeichneten morphometrischen Messungen

Plaqueablagerungen und Mineralisierungen innerhalb der Gefäßwände wurden optisch vom umliegenden Gewebe abgegrenzt, umfahren und deren Fläche vom Cell[^]F-Programm automatisch berechnet.

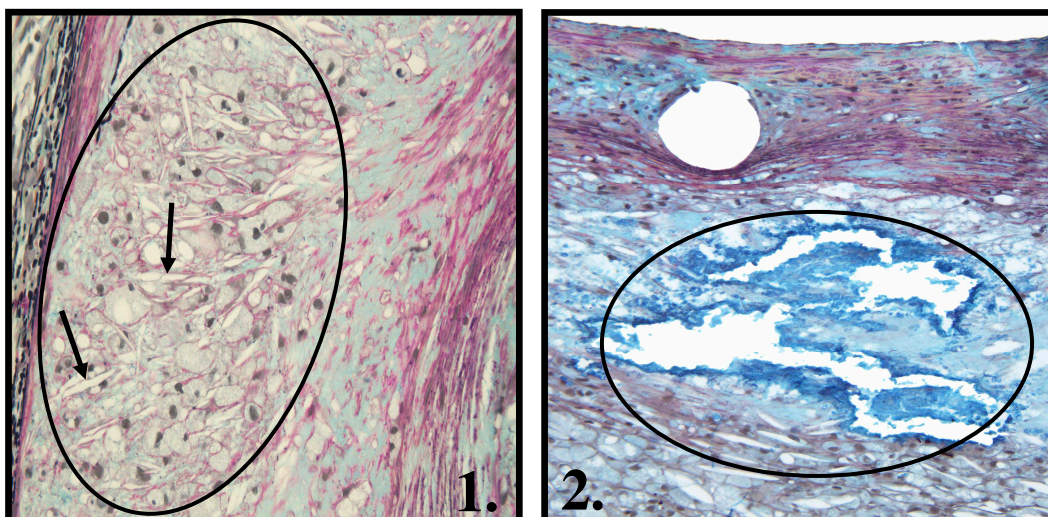


Abbildung 19: Movat-Pentachrom gefärbte histologische Schnittpräparate zur Darstellung der Messung der Plaqueablagerungen und Mineralisierungen

1. Plaqueablagerung mit eingeschlossenen Cholesterinkristallen (Pfeile)
2. herdförmige Mineralisierung in der Media

Da es anhand des OCT nicht möglich ist, die Lamina elastica interna vom umliegenden Gewebe abzugrenzen, mussten für den direkten Vergleich zwischen Histologie und OCT noch zwei weitere Parameter eingeführt werden. Dabei handelte es sich um die **Neointimafläche** (Stentfläche – Lumenfläche) und die **prozentuale Stenose** $[(\text{Neointimafläche}/\text{Stentfläche}) \cdot 100]$, welche beide noch mal zusätzlich anhand der Stentfläche ermittelt wurden.

Die Beurteilung der Einheilungsparameter erfolgte anhand der H&E-gefärbten Schnitte. Hierbei interessierten insbesondere die Parameter Fibrin, Riesenzellen und Inflammation (neutrophile und eosinophile Granulozyten). Alle Stentstreben die Fibrin und Riesenzellen aufwiesen wurden gezählt und daraus der prozentuale Anteil berechnet. Die Bewertung der Inflammation erfolgte anhand eines Scores (Tab. 4).

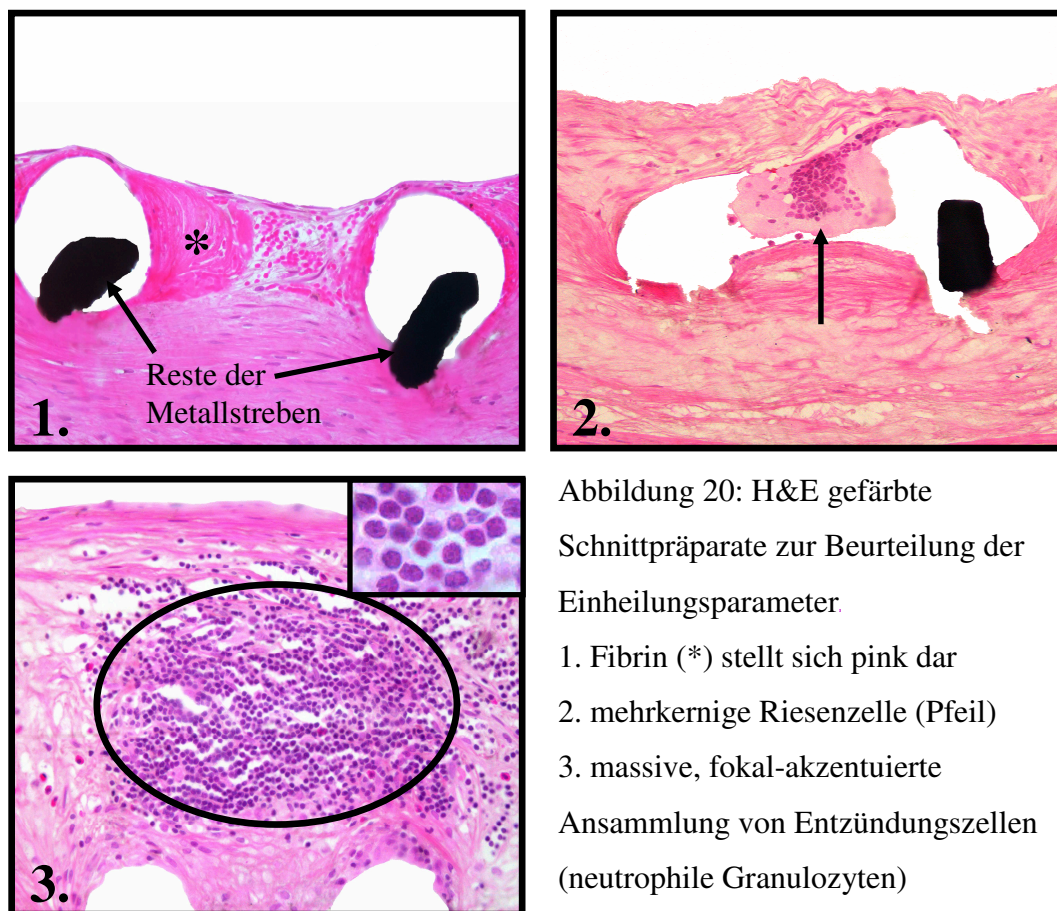


Abbildung 20: H&E gefärbte Schnittpräparate zur Beurteilung der Einheilungsparameter

Tabelle 4: Score-Tabelle zur Beurteilung der Inflammation (modifiziert nach Carter et al. 2004)

Inflammation Score

| | |
|---|---|
| 0 | keine Entzündungszellen vorhanden |
| 1 | es sind vereinzelt Entzündungszellen vorhanden |
| 2 | einige Streben weisen deutliche Entzündungszellansammlungen auf |
| 3 | massive Entzündung aller Streben |

Einen weiteren wichtigen Parameter zur Beurteilung der Stenteinheilung stellte der RUTSS Score (**R**atio of **U**ncovered to **T**otal **S**tents **S**truts) dar. Hierfür wurden alle von Gewebe bedeckten sowie unbedeckten Streben ausgezählt und der RUTSS Score mit der Formel: Anzahl der unbedeckten Streben/Anzahl aller Streben, berechnet. Je mehr er sich „1“ annäherte, desto mehr Stentstreben lagen frei. Folglich konnte mit Hilfe dieses Scores das Verhältnis zwischen den freiliegenden und bedeckten Stentstreben bestimmt und somit die Höhe des Thromboserisikos abgeschätzt werden.

3.10 Auswertung der OCT Aufnahmen und Korrelation mit histologischen Schnitten

Die Auswertung der OCT Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der OCT System Analysis Software (LightLab Imaging, Westford, MA, USA) und des OCT Standard Operating Procedure 4.0 (Imaging Core Laboratory, ISAResearch Center, Deutsches Herzzentrum und 1. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland). Mit der Messung wurde, nach einer manuellen Kalibrierung, bei dem ersten Bild (Frame) begonnen, das eine ausreichende Kontinuität an Stentstreben aufwies. Anschließend konnte jeder fünfte der insgesamt 60 Frames/Stent begutachtet und hinsichtlich Lumenfläche, Stentfläche, Anzahl unbedeckter Streben und Neointimadicke über den Streben untersucht werden (Abb. 21). Da die Auflösung des verwendeten OCT Gerätes

20 μm beträgt, musste dieser Wert bei der Messung der Neointimadicke über den einzelnen Stentstreben berücksichtigt werden. Folglich wurden Streben mit einer Neointimadicke unter 0,02 mm als unbedeckt, über 0,02 mm dementsprechend als bedeckt angesehen.

Am Ende konnte mit den ermittelten Daten, analog zur Histologie (Kapitel 3.9), die Neointimafläche, die prozentuale Stenose sowie der RUTSS Score berechnet werden.

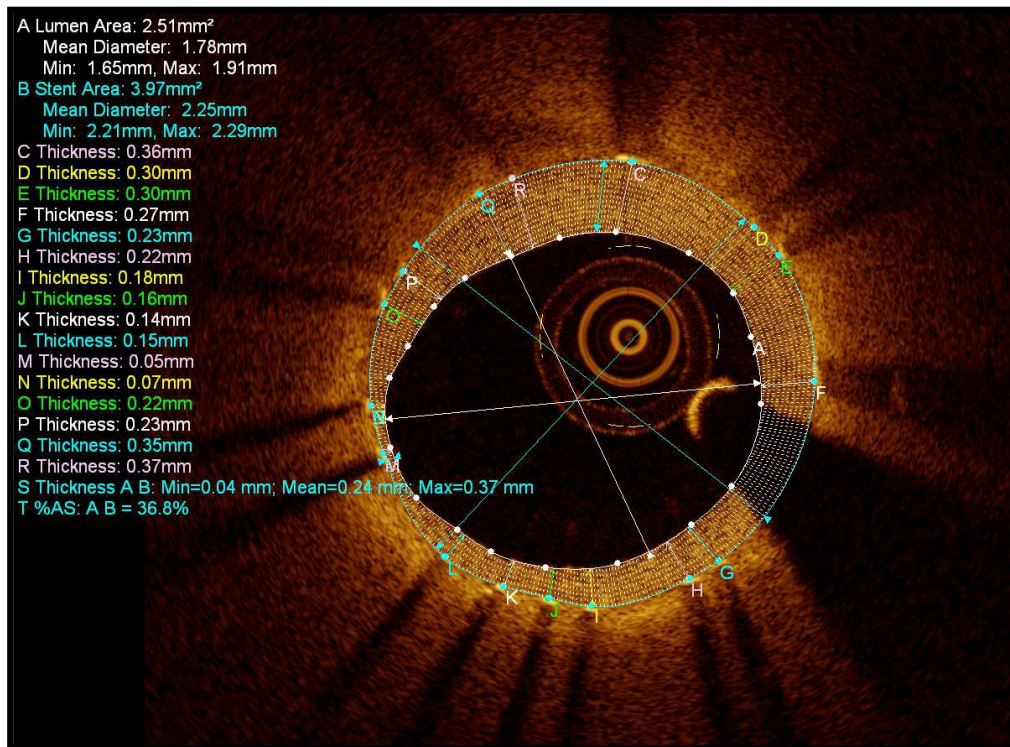


Abbildung 21: mit der OCT System Analysis Software ausgemessener OCT Frame

A=Lumenfläche; B=Stentfläche; C bis R= Neointimadicke über den einzelnen Stentstreben; S=mittlere Neointimadicke; T=prozentuale Stenose

Zur Bewertung der Zuverlässigkeit und Genauigkeit der OCT Untersuchung wurden in einem zweiten Schritt einige OCT Frames mit den entsprechenden histologischen Schnitten korreliert. Als Anhaltspunkte hierfür dienten zum einem der Abstand vom proximalen Stentende, die Anzahl und Verteilung der Stentstreben in der Arterienwand, Seitastabgänge sowie die Neointimadicke.

Anschließend wurden die gemessenen Parameter der abgeglichenen OCT Frames den Parametern der histologischen Schnitte gegenübergestellt und die entsprechenden Korrelationskoeffizienten berechnet.

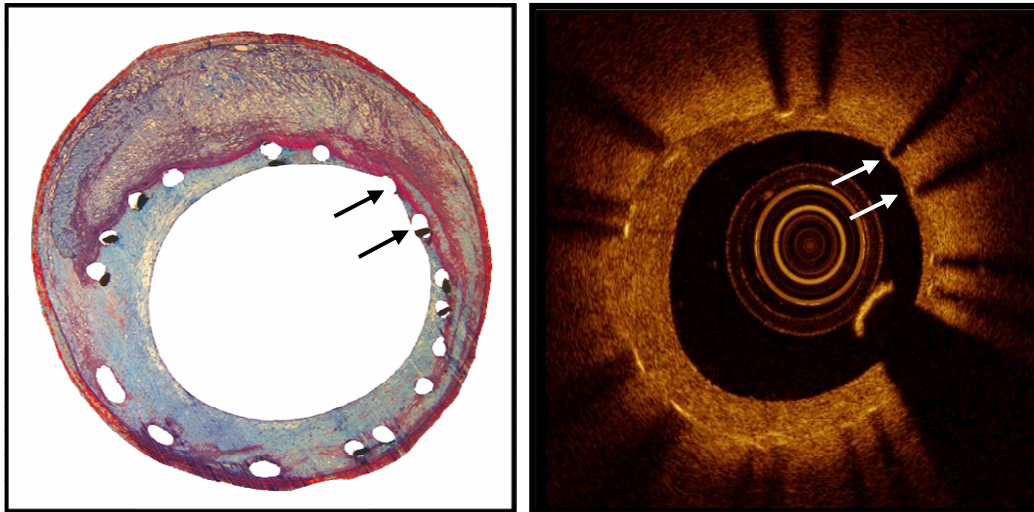


Abbildung 22: Gegenüberstellung eines Movat-Pentachrom gefärbten histologischen Schnittes (links) mit dem entsprechenden OCT Frame (rechts); die Pfeile markieren freiliegende Stentstreben

Um die Verteilung der freiliegenden Streben innerhalb der Stents und somit die Homogenität der Einheilung besser beurteilen zu können, wurden so genannte „Spread out vessel“ Graphiken angefertigt. Hierfür wurde jedem Strut pro OCT Frame, ausgehend von dessen Lage, ein Winkel (0° bis 360°) zugeteilt und dieser dann graphisch in einem Punktediagramm dargestellt (Abb. 23). Dabei erhielten unbedeckte Streben eine rote, bedeckte eine blaue Farbe.

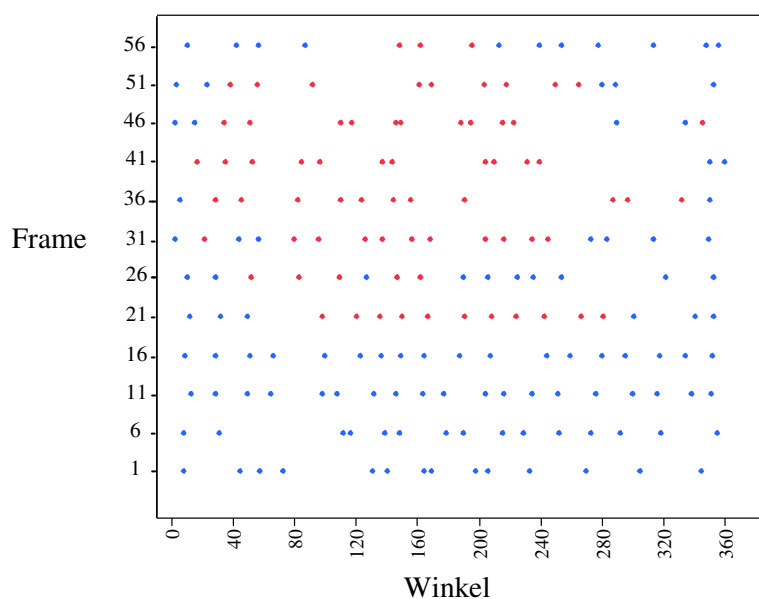


Abbildung 23: Spread out vessel Graphik eines Drug-eluting Stents

3.11 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der gestenteten Gefäßsegmente

Acht Stents von vier Tieren wurden 28 Tage nach Implantation einer rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung (REM) der Stentoberfläche unterzogen, um die Re-Endothelialisierung der Gefäße beurteilen zu können. Die Stents verteilten sich folgendermaßen: zwei Driver[®], drei Xience V[®] und drei Endeavor[®] Resolute Stents.

Die gestenteten Gefäßsegmente wurden nach der Entnahme in 4 %-igem gepuffertem Formaldehyd an ein externes Labor (CVPath Institute, Inc., Gaithersburg, USA) versendet, wo die weitere Aufbereitung der Proben nach unten genanntem Protokoll sowie die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten.

Tabelle 5: Protokoll von CVPath Institute, Inc., Gaithersburg, USA zur Aufbereitung der REM Probe

| | |
|---------------------------------|--------------|
| Waschen in PBS | 3x 15±5 min. |
| 1 % Osmium | 30±5 min. |
| Waschen in Leitungswasser | 3x 15±5 min. |
| 50 % Ethanol | 15±5 min. |
| 70 % Ethanol | 15±5 min. |
| 95 % Ethanol | 15±5 min. |
| 100 % Ethanol | 4x 15±5 min. |
| Kritischer-Punkt-Trockner (CPD) | |

Nach der Trocknung der gestenteten Gefäßproben im Kritischen-Punkt-Trockner (CPD 030, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), wurden sie longitudinal aufgeschnitten und die luminale Seite mit Gold besprüht.

Bei 15facher Vergrößerung wurden zunächst Übersichtsaufnahmen angefertigt und anschließend Detailaufnahmen in 50 - 600 facher Auflösung (Variable

Pressure Scanning Electron Microscope S-3600N, Hitachi Ltd. Corporation, Tokio, Japan) aufgenommen.

Diese wurden schließlich in digitaler Form von CVPPath Institute, Inc., Gaithersburg, USA übermittelt und anhand des Cell[^]F-Programms (Cell[^]F Software, Olympus, Hamburg, Deutschland) ausgewertet.

Durch Messung der Fläche der freiliegenden (Pfeil) und der endothelialisierten Stentstreben (gestrichelter Pfeil) konnte der prozentuale Anteil der Endothelialisierung berechnet und somit die Endothelialisierung der einzelnen Stentmodelle vergleichend beurteilt werden (Abb. 24).

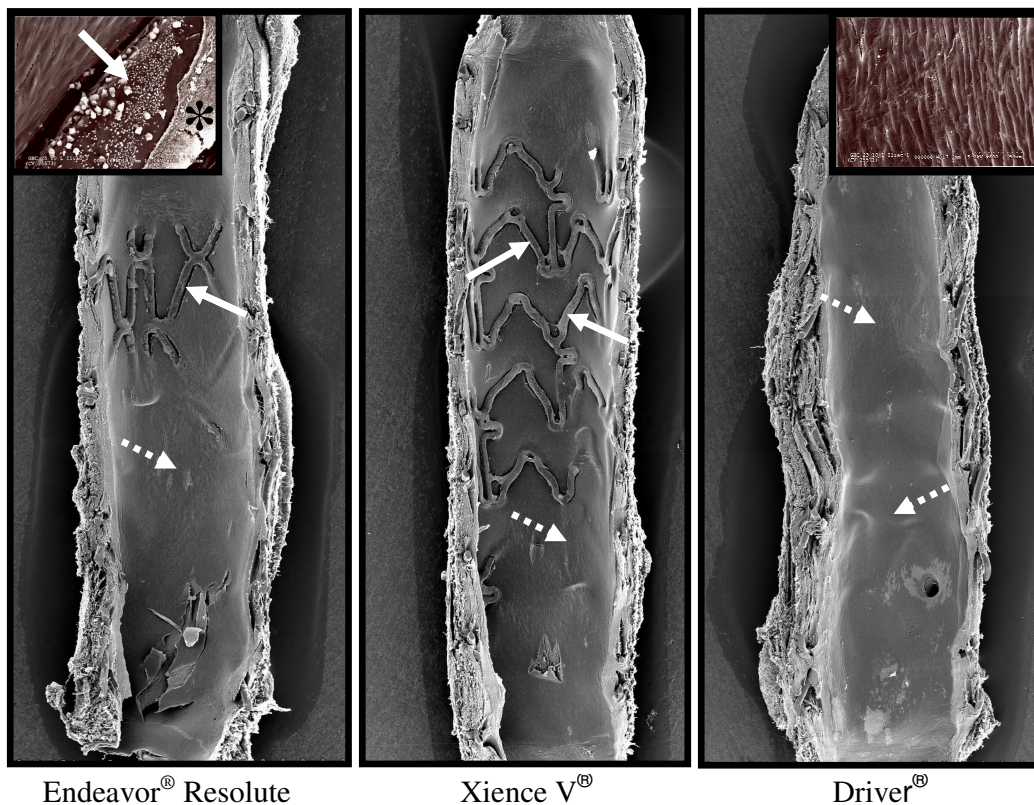


Abbildung 24: Bewertung der Endothelialisierung 28 Tage nach Stentimplantation anhand rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen (x15 und x600)

Pfeile: unbedeckte Stentstreben

Gestrichelte Pfeile: von Endothel bedeckte Stentstreben

Die 600-fache Vergrößerung des Endeavor[®] Resolute (oben links) zeigt eine unbedeckte Strebe (Pfeil) mit anhaftenden Entzündungszellen und Fibrin (*)

Die 600-fache Vergrößerung des Driver[®] (oben rechts) lässt durchgehend Endothelzellen erkennen

3.12 Etablierung einer Graustufenmessung zur Gewebecharakterisierung mittels OCT

Wie bereits erwähnt, eignet sich das OCT zur Bewertung von morphometrischen Parametern und der Stenteinheilung. Bezüglich der Zusammensetzung sowie des Reifegrades von Geweben über und zwischen den Stentstreben, erlaubt es jedoch keine Aussage. So kann es vorkommen, dass Streben welche zwar von neointimalem Gewebe bedeckt sind als gut eingeheilt angesehen werden, in Wahrheit aber von unreifer, thrombogener Neointima umgeben sind.

In diesem Zusammenhang wird eine gesunde Neointima von Farb et al. (1999) und Virmani et al. (2003) als „reich an glatten Gefäßmuskelzellen“ und eine in der Heilung verzögerte Neointima als „proteoglykanreiche Matrix mit einem Mangel an glatten Gefäßmuskelzellen“ bezeichnet.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, durch die Etablierung einer Graustufenmessung, das luminal liegende Gewebe über den Streben zuverlässig als verheilt („reif“) oder unreif charakterisieren zu können.

Hierzu wurde eine Auswahl an H&E-gefärbten Schnitten, die reife und unreife neointimale Anteile aufwiesen, den exakt korrespondierenden OCT Frames gegenübergestellt. Der entsprechende OCT Frame wurde nun mit Hilfe der Adobe® Photoshop® CS4 Software (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland), zur besseren Unterscheidbarkeit der einzelnen Gewebeschichten, in Graustufen umgewandelt (Abb. 25).

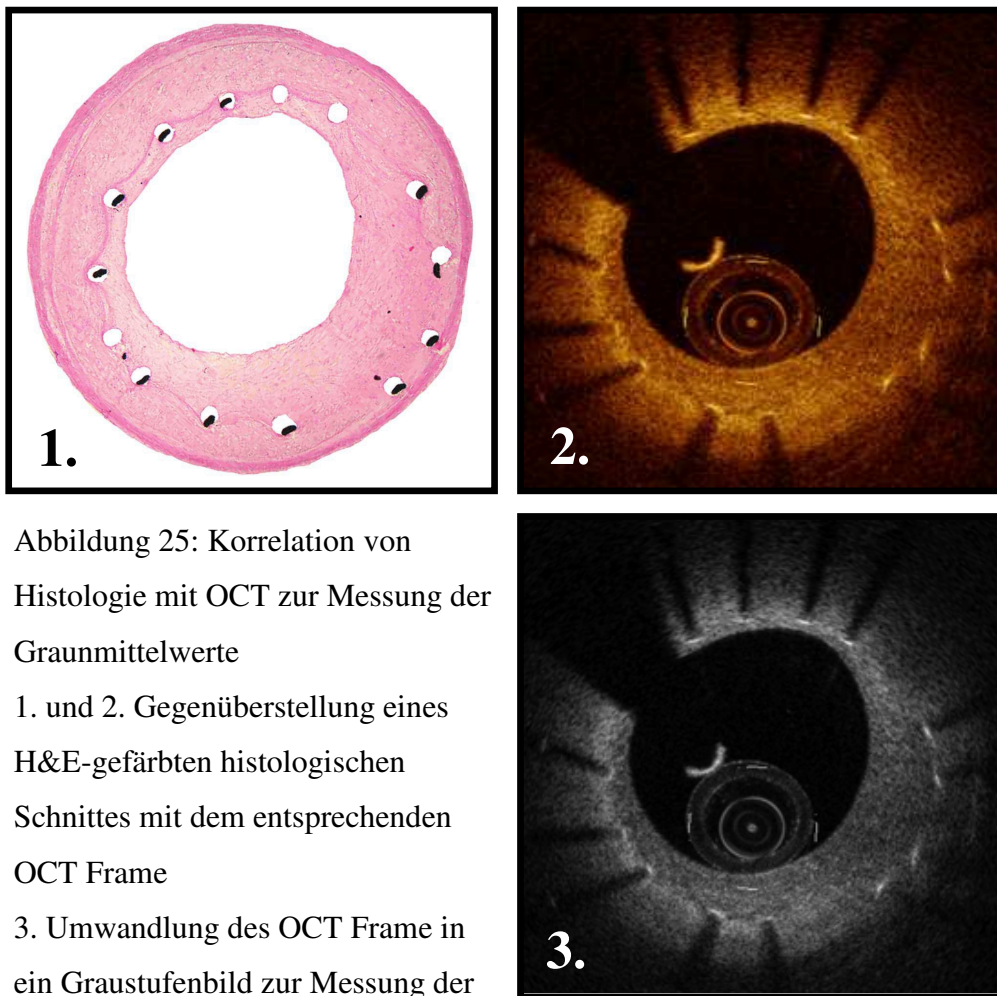


Abbildung 25: Korrelation von Histologie mit OCT zur Messung der Graunmittelwerte

1. und 2. Gegenüberstellung eines H&E-gefärbten histologischen Schnittes mit dem entsprechenden OCT Frame
3. Umwandlung des OCT Frame in ein Graustufenbild zur Messung der Graunmittelwerte

Die Messung selbst erfolgte ebenfalls mit diesem Programm. Nach einer Helligkeitsanpassung jedes einzelnen OCT Frames konnten die Bereiche, welche zuvor anhand der histologischen Schnitte als „reif“ oder „unreif“ identifiziert wurden, umfahren werden (Abb. 26). Das Programm errechnete danach automatisch den Graumittelwert für jedes einzelne Areal. Insgesamt wurden auf diese Art und Weise 177 Areale von 11 Tieren vermessen und aus den erhaltenen Werten eine Receiver-Operating-Characteristic (ROC) Kurve erstellt sowie der Cut-Off Wert berechnet. Mit Hilfe dieses Wertes und der ROC Kurve konnte bestimmt werden, bei welchen Graumittelwerten es sich mit einer x %-igen Spezifität und einer x %-igen Sensitivität um reifes neointimales Gewebe handelt.

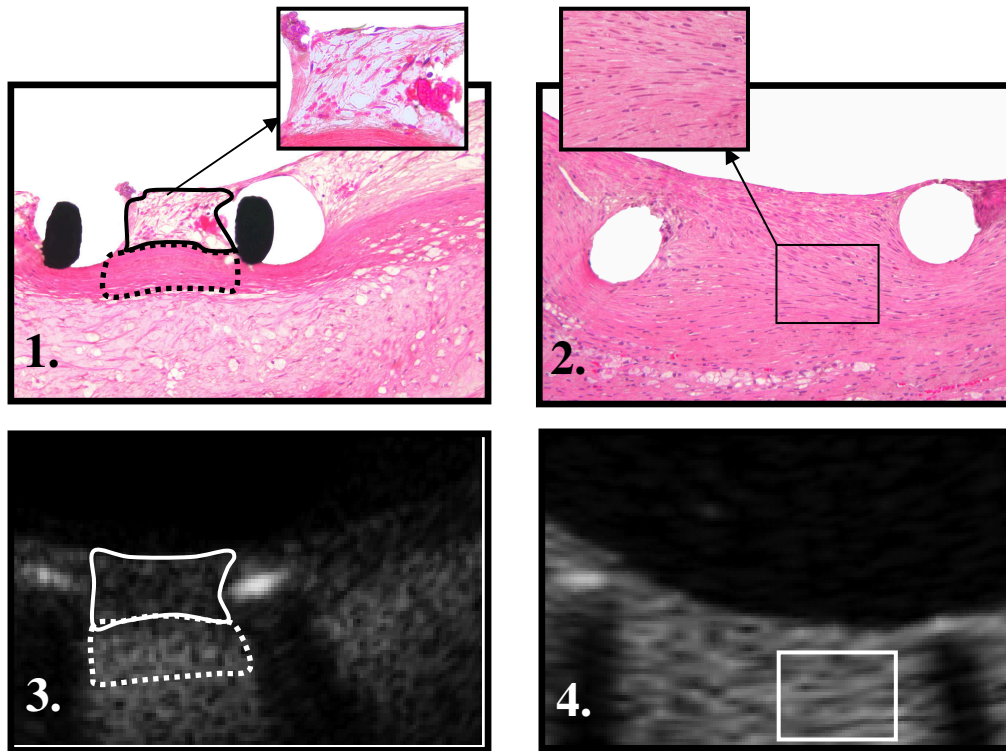


Abbildung 26: Gegenüberstellung von H&E-gefärbten histologischen Vergrößerungen (x 20) (1. und 2.) mit den entsprechenden, in Graustufen umgewandelten OCT Ausschnitten (3. und 4.)

1. und 3.: (—) zeigt unreife, proteoglykanreiche Neointima; (.....) zeigt reife Neointima mit glatten Gefäßmuskelzellen

2. und 4.: Ausschnitte stellen reife Neointima mit glatten Gefäßmuskelzellen dar

3.13 Humane OCT Daten

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einheilungsverlauf von Drug-eluting Stents im atherosklerotischen Tiermodell mit der Situation im Menschen zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden humane OCT Daten von 12 Patienten, welche an einer Studie (Clinical Trial Registration: NCT NCT01230723) des Deutschen Herzzentrums München teilgenommen haben, erhoben. Jeder Patient mit einer stabilen Koronarerkrankung und ohne Anzeichen akuter Symptome, erhielt 1:1 randomisiert entweder einen Xience V[®] oder einen Endeavor[®] Resolute Stent. Bei den gestenteten Koronargefäßen handelte es sich um unbehandelte (naive) Gefäße mit einer nach AHA Klassifizierung Typ A oder B1 einfachen atherosklerotischen

Läsion. Dies bedeutet, dass die Stents, wie auch bei den Kaninchen, ausschließlich in gerade, nicht thrombosierte Gefäße ohne Bifurkationen implantiert wurden.

Im Zuge der Follow-up Koronarangiographie sechs Monate nach Stent-implantation, erfolgte die OCT Untersuchung mit dem nicht-okklusiven C7-XR™ FD-OCT Imaging System (LightLab Imaging, Westford, MS, USA). Hierbei handelte es sich um das gleiche System, dass auch bei den Kaninchen angewendet wurde.

Die Vermessung der einzelnen Frames wurde, analog zu den Kaninchen, mit Hilfe der OCT System Analysis Software (LightLab Imaging, Westford, MA, USA) und gemäß dem OCT Standard Operating Procedure 4.0 (Imaging Core Laboratory, ISAResearch Center, Deutsches Herzzentrum and 1. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland) durchgeführt.

Nachdem die Graustufenmessung zur Gewebecharakterisierung mittels OCT im Tiermodell etabliert werden konnte, wurde sie in einem zweiten Schritt auch auf humane OCT Frames angewendet.

Hierfür wurden 22 OCT Frames von fünf Patienten herangezogen, um die Graumittelwerte der Gewebeareale über den Stentstreben zu bestimmen. Nach Messung von 66 Gewebearealen und der Berechnung aller Graumittelwerte, konnten diese nun dem zuvor im Tiermodell errechneten Cut-Off Wert gegenübergestellt und so die Art des Gewebes bestimmt werden.

3.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit dem Programm JMP® (Version 9.0.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) und MedCalc® (MedCalc Software, Version 12.3.0., Mariakerke, Belgien). Als deskriptive Statistiken zur Beschreibung der Lage und Streuung wurden für die stentbezogenen Mittelwerte der interessierenden Parameter Durchschnittswerte \pm Standardabweichungen angegeben.

Eine Überprüfung aller Parameter hinsichtlich signifikanter Abweichungen von der Normalverteilungsannahme wurde durch den Shapiro–Wilk–W-Test

vorgenommen. Bei nicht normal verteilten Werten kam, je nach Anzahl der Vergleichsgruppen, der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test (>2 Vergleichsgruppen) bzw. der Mann-Whitney U (2 Vergleichsgruppen) zum Einsatz. War der globale Test auf Gruppenheterogenität mittels Kruskal-Wallis Test signifikant, erfolgten paarweise post-hoc Vergleiche ebenfalls mittels Mann-Whitney U Test. Führt der Shapiro-Wilk-W-Test nicht zur Ablehnung der Nullhypothese (Vorliegen normalverteilter Daten), kam als inferenzstatistisches Auswertungsverfahren für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen die einfache Varianzanalyse (ANOVA: analysis of variance) zum Einsatz. Bei Zweigruppenvergleichen bzw. im Falle signifikanter ANOVA-Omnibustests wurde der Student t-Test angewendet.

Für alle statistischen Tests wurde ein zweiseitiges Signifikanzniveau von 5% zu Grunde gelegt. Aufgrund der Komplexität der Fragestellung und der daraus resultierenden Vielzahl an statistischen Vergleichs- und Zusammenhagsuntersuchungen, konnte der Problematik des multiplen Testens (Erhöhung der Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art mit zunehmender Anzahl durchgeführter Tests) nicht effizient Rechnung getragen werden. In Anlehnung an Savilles (1990) Vorschlag eines praktikablen Umgangs mit dem multiplen Testproblem, wurden alle durchgeführten Vergleiche vollständig offen gelegt, um eine informelle Adjustierung der berichteten p-Werte im Zuge der Ergebnisinterpretation zu ermöglichen.

Die Überprüfung der Übereinstimmung von OCT Daten mit den entsprechenden histologischen Daten erfolgte deskriptiv mittels Bland-Altman-Plots unter Angabe des mittleren systematischen Fehlers (Bias) und der 95% Übereinstimmungsgrenzen (limits of agreement), welche den Wertebereich angeben, in dem mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit Einzelabweichungen zwischen OCT- und Histologiemessungen erwartet werden können. Bei diesen Auswertungen wurde dem Gegenstand wiederholter Messungen je Individuum (mehrere Frames pro Stent) Rechnung getragen (Bland und Altman 2007).

Weiterführend wurden, um die Stärke des Intra-Individuellen Zusammenhangs zwischen OCT- und Histologiemessungen zu quantifizieren, partielle Korrelationskoeffizienten berechnet (Bland und Altman 1995). Die statistische Auswertung erfolgte unter beratender Hilfestellung des Instituts für Medizinische

Statistik und Epidemiologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (Diplom Statistiker Dr. rer. nat. Tibor Schuster).

4. Ergebnisse

4.1 Präklinische Daten

4.1.1 Blutparameter

Im Zuge der Fütterung mit der cholesterinhaltigen Diät zeigten alle Tiere einen kontinuierlichen Anstieg des Plasma-Cholesterins bis zur Denudation und einen leichten Abfall zum Zeitpunkt der Futterumstellung. Mit Wechsel auf die Nieder-Cholesterindiät stieg der Cholesterinspiegel wieder an und erreichte seinen Höhepunkt 13 Wochen nach Fütterungsbeginn. Die Tiere aus der 42-Tages Gruppe wurden noch 14 Tage länger (insgesamt 15 Wochen) gefüttert wobei der Cholesterinwert wieder etwas abfiel (Abb. 27). Die Konzentrationen der Gallensäuren stiegen bis zur Umstellung auf die Nieder-Cholesterindiät stetig, sanken zum Zeitpunkt der Implantation kurz ab und erreichten, wie auch die Cholesterinwerte, ihren Höhepunkt nach 13 Wochen, wobei der Gehalt zum Zeitpunkt der Euthanasie nach 42 Tagen nicht untersucht wurde (Tab. 6).

Tabelle 6: Plasmaparameter der Kaninchen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

| | Denuda- tion | Futter- umstellung | Implan- tation | Eutha. 28 Tage | Eutha. 42 Tage |
|------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Cholesterin mg/dl | 927±380 | 878±626 | 973±425 | 1244±846 | 888±299 |
| Gallensäuren µmol/l | 7±6 | 20±10 | 14±11 | 30±20 | n.u. |

n.u. = nicht untersucht

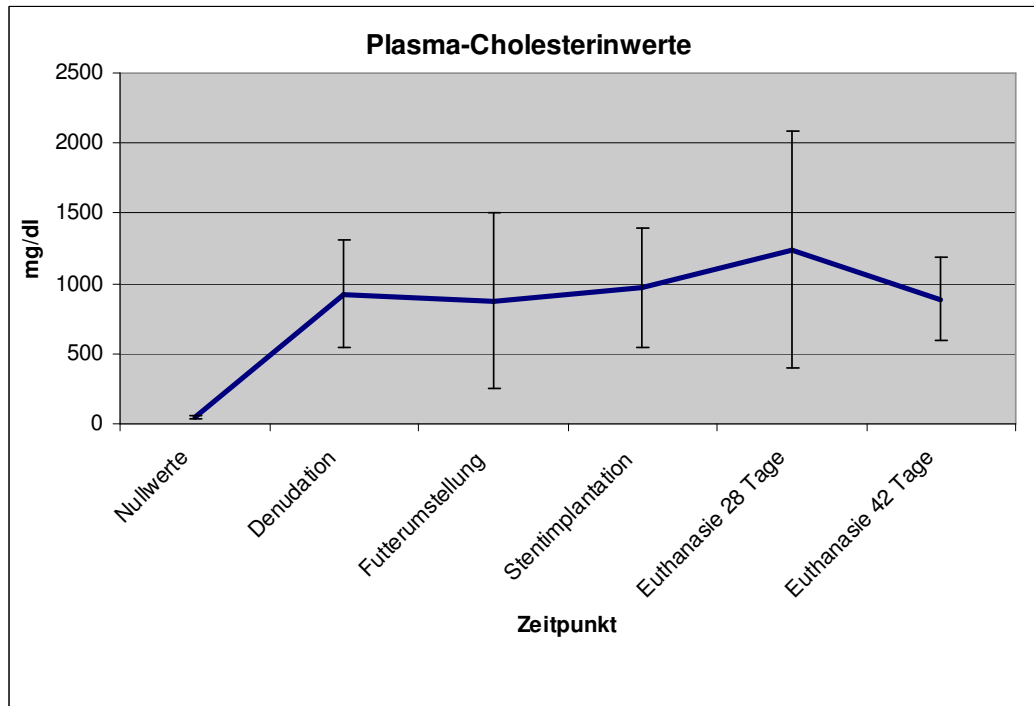


Abbildung 27: graphischer Verlauf der Plasma-Cholesterinwerte mit einfachen Standardabweichungen (es sei zu beachten, dass die Plasma-Cholesterinwerte nicht zu äquidistanten Messzeitpunkten erhoben wurden, so dass die abgebildeten Mittelwertanstiege nur unter Berücksichtigung des jeweils gegebenen Zeitintervalls interpretiert und verglichen werden können.)

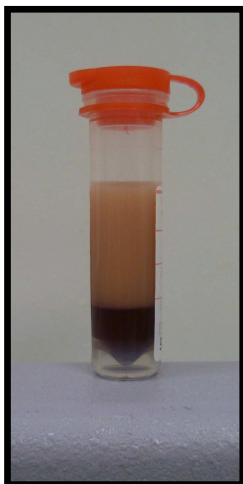


Abbildung 28: makroskopisch sichtbare Lipämie zum Zeitpunkt der Euthanasie 42 Tage nach Stentimplantation

4.1.2 Histologische Ergebnisse nach 28 Tagen

4.1.2.1 Morphometrie

Nach Messung der morphometrischen Parameter (Tab. 7) wies der Xience V[®] deutlich niedrigere Werte bei den Flächen innerhalb der EEL und IEL sowie der Stentfläche auf als die beiden anderen Stents. Bezüglich der Lumenfläche ließ er signifikant geringere Wert gegenüber dem Endeavor[®] Resolute erkennen.

Des Weiteren entwickelte der Driver[®] Stent eine deutlich größere Neointimafläche (IEL) im Vergleich zu den medikamentenbeschichteten Stents. Bei der Neointimafläche (Stentfläche), der prozentualen Stenose (Stentfläche) und der mittleren Gesamtneointimadicke unterschied er sich jedoch nur vom Xience V[®] Stent signifikant.

Die Größe der Plaquefläche und der Mineralisierung war bei allen drei untersuchten Stents nahezu identisch.

Tabelle 7: Vergleich der histomorphometrischen Parameter der einzelnen Stents 28 Tage nach Implantation

| | Driver [®] | Xience V [®] | Endeavor [®] Resolute | p - Wert |
|---|---------------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| Fläche innerhalb der EEL, mm ² | 7,3±1,1 | 6,3±0,4 | 7,6±0,4 | 0,014*[‡] |
| Fläche innerhalb der IEL, mm ² | 5,1±0,6 | 3,5±0,4 | 5,3±1,0 | 0,083*[‡] |
| Lumenfläche, mm ² | 3,4±0,8 | 2,7±0,3 | 4,0±1,1 | 0,035[‡] |
| Stentfläche, mm ² | 4,2±0,5 | 3,0±0,3 | 4,5±0,9 | 0,006*[‡] |
| Neointimafläche ermittelt anhand der IEL, mm ² | 1,7±0,3 | 0,8±0,3 | 1,2±0,4 | 0,001*^{+‡} |
| Neointimafläche ermittelt anhand der Stentfläche, mm ² | 0,8±0,4 | 0,3±0,2 | 0,4±0,3 | 0,028* |

Weiterführung der Tabelle 7

| | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|---------------|
| % Stenose ermittelt anhand der IEL | 33,4±8,4 | 23,1±5,9 | 24,5±10,3 | 0,103 |
| % Stenose ermittelt anhand der Stentfläche | 19,9±10,8 | 9,2±6,8 | 10,8±9,1 | 0,031* |
| Neointimadicke über den Streben, mm | 0,14±0,07 | 0,06±0,04 | 0,08±0,06 | 0,130 |
| Neointimadicke zw. den Streben, mm | 0,21±0,09 | 0,12±0,04 | 0,15±0,07 | 0,114 |
| Mittlere Gesamt-neointimadicke, mm | 0,17±0,07 | 0,09±0,04 | 0,12±0,06 | 0,031* |
| Plaquesfläche, mm ² | 1,8±1,4 | 1,1±0,3 | 1,2±0,7 | 0,372 |
| Mineralisierung, mm ² | 0,01±0,01 | 0,02±0,02 | 0,05±0,07 | 0,324 |

* Driver[®] vs. Xience V[®]; ⁺ Driver[®] vs. Endeavor[®] Resolute; [‡] Xience V[®] vs. Endeavor[®] Resolute

4.1.2.2 Einheilungsparameter

Alle drei Stents wiesen signifikant unterschiedliche Werte im Hinblick auf das Vorkommen von Fibrin auf (Tab. 8). Während beim Driver[®] nur 2,2 % der Streben Fibrinansammlungen erkennen ließen, waren es beim Endeavor[®] Resolute 28,4 % und beim Xience V[®] 55,5 %. Im Gegensatz hierzu zeigte der Xience V[®] eine signifikant geringere Anzahl an Streben mit Riesenzellen als die beiden anderen Stents. Beim Inflammationscore wies der Driver[®] die deutlich höchsten Werte auf. Des Weiteren hob er sich mit seinem niedrigen Anteil an unbedeckten Stentstreben (RUTSS) signifikant von den anderen beiden Stents ab.

Tabelle 8: Vergleich der Einheilungsparameter der einzelnen Stents 28 Tage nach Implantation

| | Driver [®] | Xience V [®] | Endeavor [®] Resolute | p - Wert |
|----------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| % Streben mit Fibrin | 2,2±3,4 | 55,5±24,3 | 28,4±27,0 | 0,002*⁺ |
| % Streben mit Riesenzellen | 66,3±16,5 | 39,4±10,5 | 67,2±14,2 | 0,005*[‡] |
| Inflammation-score | 1,1±0,4 | 0,5±0,1 | 0,6±0,3 | 0,011*⁺ |
| RUTSS Score | 0,001±0,002 | 0,32±0,17 | 0,21±0,14 | 0,005*⁺ |

* Driver[®] vs. Xience V[®]; ⁺ Driver[®] vs. Endeavor[®] Resolute; [‡] Xience V[®] vs. Endeavor[®] Resolute

4.1.3 Histologische Ergebnisse nach 42 Tagen

4.1.3.1 Morphometrie

42 Tage nach der Implantation zeigten sich bei den morphometrischen Parametern (Tab. 9) signifikant niedrigere Werte des Xience V[®] bezüglich der Neointimafläche (IEL) und der prozentualen Stenose (IEL). Bei der prozentualen Stenose (Stentfläche), der Neointimadicke über den Streben und der mittleren Gesamtneointimadicke wiesen seine geringen Werte nur gegenüber dem Endeavor[®] Resolute deutliche Unterschiede auf.

Bezüglich der Plaquefläche und der Mineralisierung ließen die untersuchten Stents annähernd identische Werte erkennen.

Tabelle 9: Vergleich der histomorphometrischen Parameter der einzelnen Stents
42 Tage nach Implantation

| | Driver [®] | Xience V [®] | Endeavor [®] Resolute | p - Wert |
|---|---------------------|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Fläche innerhalb der EEL, mm ² | 6,0±0,7 | 5,8±0,7 | 6,6±0,8 | 0,176 |
| Fläche innerhalb der IEL, mm ² | 4,4±0,4 | 4,0±0,1 | 4,4±0,4 | 0,078 |
| Lumenfläche, mm ² | 2,7±0,6 | 2,9±0,2 | 2,6±0,5 | 0,601 |
| Stentfläche, mm ² | 3,7±0,4 | 3,4±0,1 | 3,6±0,3 | 0,250 |
| Neointimafläche ermittelt anhand der IEL, mm ² | 1,7±0,7 | 1,1±0,1 | 1,7±0,7 | 0,023*[‡] |
| Neointimafläche ermittelt anhand der Stentfläche, mm ² | 1,0±0,7 | 0,5±0,1 | 1,0±0,7 | 0,05 |
| % Stenose ermittelt anhand der IEL | 39,2±13,5 | 27,8±2,8 | 39,4±13,3 | 0,031*[‡] |
| % Stenose ermittelt anhand der Stentfläche | 26,7±16,2 | 14,8±2,6 | 27,3±15,4 | 0,042[‡] |
| Neointimadicke über den Streben, mm | 0,17±0,12 | 0,10±0,02 | 0,19±0,13 | 0,031[‡] |
| Neointimadicke zw. den Streben, mm | 0,25±0,12 | 0,14±0,02 | 0,25±0,13 | 0,137 |
| Mittlere Gesamt-neointimadicke, mm | 0,21±0,12 | 0,12±0,02 | 0,22±0,13 | 0,047[‡] |
| Plauefläche, mm ² | 1,3±0,1 | 0,8±0,1 | 1,5±0,1 | 0,203 |
| Mineralisation, mm ² | 0,002±0,002 | 0,009±0,01 | 0,009±0,02 | 0,443 |

* Driver[®] vs. Xience V[®]; ⁺ Driver[®] vs. Endeavor[®] Resolute; [‡] Xience V[®] vs.

Endeavor[®] Resolute

4.1.3.2 Einheilungsparameter

Die Einheilungsparameter (Tab. 10) ließen nach 42 Tagen einen signifikanten Unterschied zwischen dem niedrigen Wert des Driver[®] und dem höheren Wert des Xience V[®] im Hinblick auf Fibrinansammlungen erkennen. Im Gegensatz hierzu zeigte der Driver[®] deutlich mehr Inflammation als die medikamentenbeschichteten Stents.

Tabelle 10: Vergleich der Einheilungsparameter der einzelnen Stents 42 Tage nach Implantation

| | Driver [®] | Xience V [®] | Endeavor [®] Resolute | p - Wert |
|-------------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------|
| % Streben mit Fibrin | 5,3±6,3 | 29,1±20,6 | 14,7±6,0 | 0,019* |
| % Streben mit Riesenzellen | 56,2±8,8 | 48,1±11,2 | 46,6±21,4 | 0,502 |
| Inflammationscore | 1,2±0,3 | 0,8±0,3 | 0,8±0,2 | 0,039*+ |
| RUTSS Score | 0,028±0,05 | 0,15±0,18 | 0,11±0,12 | 0,177 |

* Driver[®] vs. Xience V[®]; + Driver[®] vs. Endeavor[®] Resolute; ‡ Xience V[®] vs. Endeavor[®] Resolute

4.1.4 präklinische OCT Ergebnisse

4.1.4.1 OCT Daten nach 28 Tagen

Bei den OCT Ergebnissen nach 28 Tagen (Tab. 11) wies der Driver[®] bezüglich der Neointimafläche einen signifikant höheren Wert auf als der Xience V[®]. Zudem unterschied er sich hinsichtlich seines geringen Anteils an unbedeckten Streben (RUTSS) deutlich von den beiden medikamentenbeschichteten Stents.

Bei den restlichen Parametern wies der Xience V[®] die niedrigsten Werte auf, wobei sich seine geringe Stentfläche signifikant vom Driver[®] und Endeavor[®] Resolute abhob.

Tabelle 11: Vergleich der OCT Parameter der einzelnen Stents 28 Tage nach Implantation

| | Driver [®] | Xience V [®] | Endeavor [®] Resolute | p - Wert |
|--|---------------------|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Lumenfläche, mm ² | 3,3±0,5 | 2,9±0,4 | 3,9±0,8 | 0,052 |
| Stentfläche, mm ² | 4,2±0,4 | 3,3±0,4 | 4,5±0,7 | 0,002*[‡] |
| Neointimafläche, mm ² | 0,9±0,3 | 0,4±0,2 | 0,7±0,3 | 0,042* |
| % Stenose | 20,7±8,9 | 10,8±6,7 | 14,5±7,6 | 0,119 |
| Neointimadicke über den Streben, mm | 0,13±0,05 | 0,07±0,04 | 0,10±0,05 | 0,107 |
| RUTSS Score | 0,03±0,03 | 0,45±0,17 | 0,32±0,22 ⁺ | 0,001*⁺ |

* Driver[®] vs. Xience V[®]; ⁺ Driver[®] vs. Endeavor[®] Resolute; [‡] Xience V[®] vs. Endeavor[®] Resolute

4.1.4.2 OCT Daten nach 42 Tagen

42 Tage nach Stentimplantation ließen die OCT Daten (Tab. 12) signifikante Unterschiede zwischen dem Xience V[®] und dem Endeavor[®] Resolute bezüglich der Neointimafläche und der Neointimadicke über den Streben erkennen. Es zeigte sich tendenziell, dass der Xience V[®] im Vergleich zu den anderen beiden Stents den geringsten Grad an Neointimawachstum aufwies, was wiederum mit einer geringeren prozentualen Stenose und einem erhöhten RUTSS Score verbunden war.

Tabelle 12: Vergleich der OCT Parameter der einzelnen Stents 42 Tage nach Implantation

| | Driver [®] | Xience V [®] | Endeavor [®] Resolute | p - Wert |
|--|---------------------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Lumenfläche, mm ² | 2,7±0,5 | 2,9±0,1 | 2,7±0,4 | 0,589 |
| Stentfläche, mm ² | 3,6±0,3 | 3,6±0,1 | 3,8±0,2 | 0,341 |
| Neointimafläche, mm ² | 0,9±0,4 | 0,7±0,2 | 1,1±0,5 | 0,046[‡] |
| % Stenose | 26,5±11,8 | 19,6±4,9 | 29,5±11,4 | 0,166 |
| Neointimadicke über den Streben, mm | 0,16±0,08 | 0,12±0,03 | 0,19±0,09 | 0,025[‡] |
| RUTSS Score | 0,03±0,06 | 0,15±0,14 | 0,09±0,11 | 0,125 |

* Driver[®] vs. Xience V[®]; ⁺ Driver[®] vs. Endeavor[®] Resolute; [‡] Xience V[®] vs. Endeavor[®] Resolute

4.1.4.3 Validierung der OCT Messung anhand der Histologie

Insgesamt konnten 136 OCT Frames von 9 Tieren den entsprechenden histologischen Schnitten gegenübergestellt werden. Die Auswertung aller 1:1 korrelierten histologischen Schnitte und OCT Frames ergab für alle Parameter starke positive und durchgängig statistisch signifikante partielle Korrelationskoeffizienten ($r_{\text{Inner-Subjekt}}$) (Tab. 13).

Tabelle 13: Korrelationskoeffizienten der gemessenen und berechneten Parameter

| | Lumenfläche, mm ² | Stentfläche, mm ² | Neointimafläche ermittelt anhand der Stentfläche, mm ² |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|
| r Inner- Subjekt | +0,93 | +0,93 | +0,93 |

| | % Stenose ermittelt anhand der Stentfläche | RUTSS |
|---------------------|---|-------|
| r Inner- Subjekt | +0,92 | +0,85 |

Diese Ergebnisse, in Verbindung mit der sich für alle Individuen konsistent abbildende lineare Beziehung der OCT-Histologie-Vergleichsmessungen (Abb. 29), unterstützen zunächst die Hypothese einer möglichen Gleichwertigkeit beider Verfahren. Dennoch wurde, um das Ausmaß individueller- sowie potenziell systematischer Abweichungen beider Messmethoden zu quantifizieren, eine Bland-Altman-Übereinstimmungsanalyse durchgeführt. Diese Ergebnisse finden sich in Abbildung 30.

Für die Lumenfläche zeigte sich eine mittlere systematische Abweichung (Bias) von lediglich 0,02 mm² (geringfügig höhere Werte bei OCT). Die 95% Grenzen der Übereinstimmung einzelner Messwerte wurden auf -0,72 bis +0,68 (Histologie minus OCT). Es war eine leichte Tendenz erkennbar, dass insbesondere auf höherem Messniveau (mittlere Lumenflächen ≥ 4 mm²) die histologischen Messwerte etwas höher ausfielen als die OCT Werte.

Dieser Trend war auch bei der Stentfläche (Bias = 0,12) und der Neointimafläche (Bias = 0,56) erkennbar. Der RUTSS Score (Bias = 0,06) hingegen zeigte insgesamt eine größere Streuung und wies bei mittleren Werten zwischen 0,4 und 0,9 tendenziell etwas höhere OCT Werte auf als die Histologie.

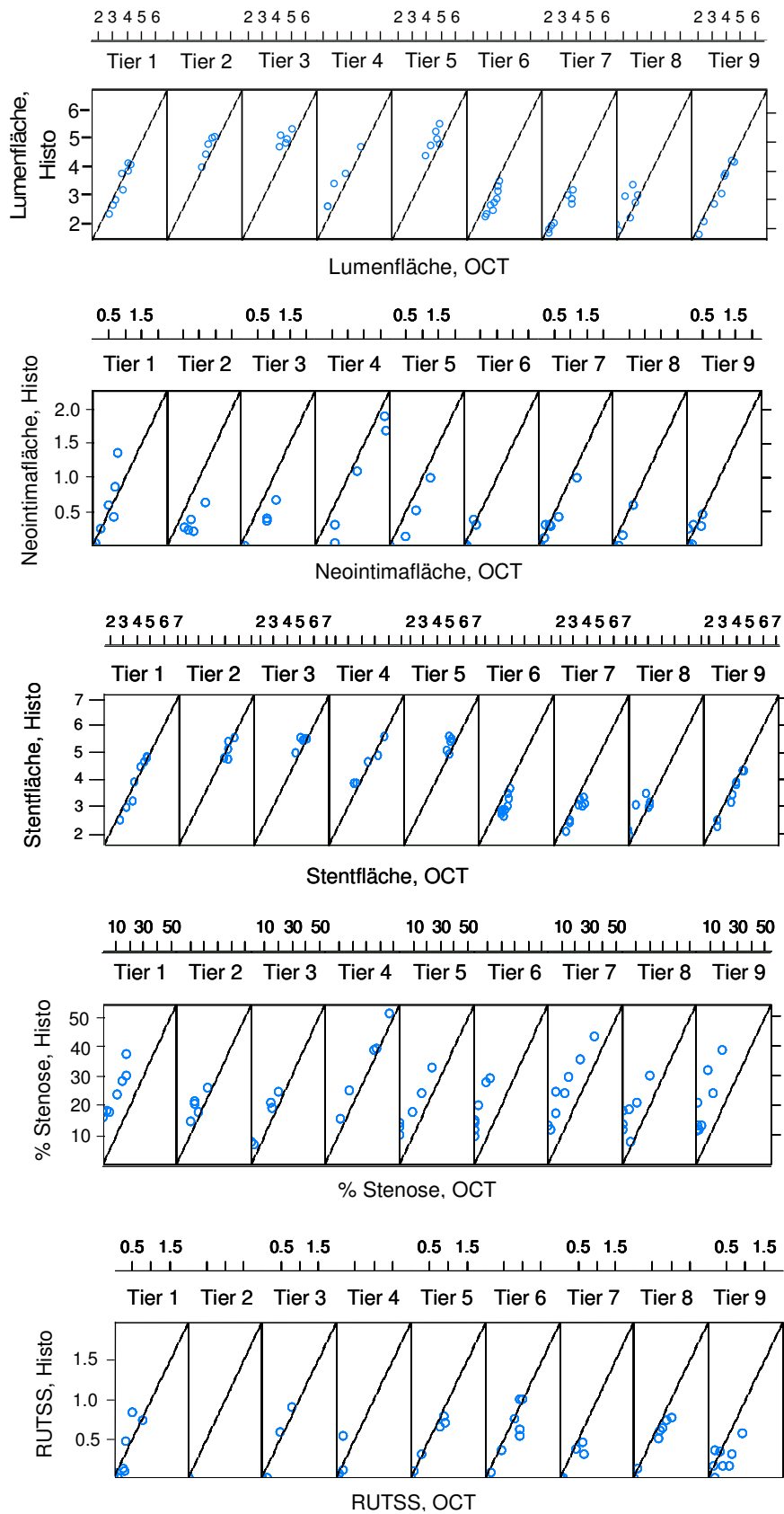


Abbildung 29: graphische Darstellung der Intra-individuellen Korrelationen zwischen den Parametern der Histologie und des OCT (durchgezogene Linien entsprechen der idealen Übereinstimmungslinie (Winkelhalbierende)).

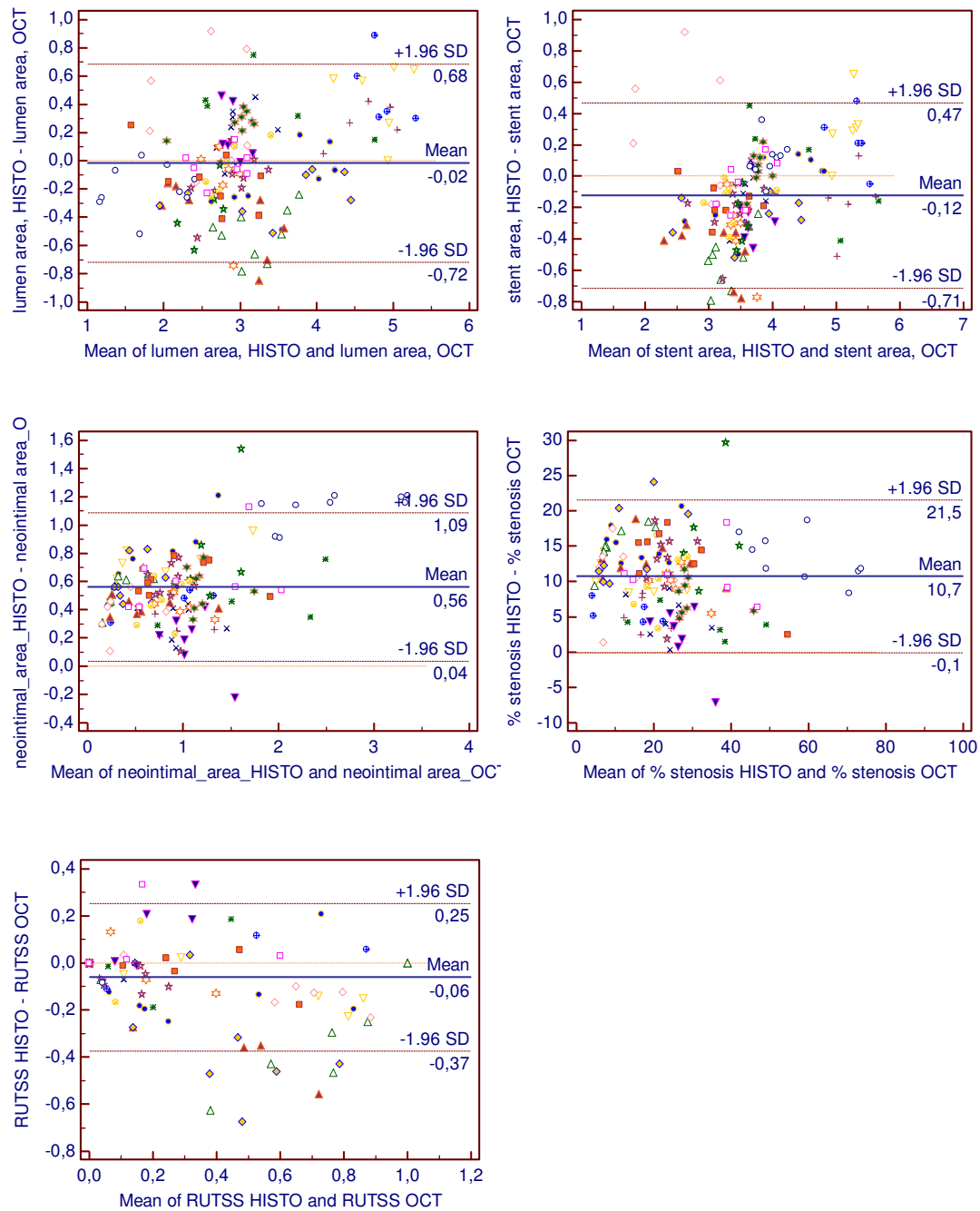


Abbildung 30: Bland-Altman-Plots zur graphischen Darstellung der individuellen Abweichungen zwischen den Parametern der Histologie und des OCT

4.2 Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse nach 28 Tagen

Bei der Rasterelektronenmikroskopie 28 Tage nach der Stentimplantation ließ der Driver[®] eine vollständig abgeschlossene Endothelialisierung erkennen und unterschied sich damit signifikant von den beiden DES (Tab. 14).

Tabelle 14: Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung 28 Tage nach Stentimplantation

| | Driver [®] | Xience V [®] | Endeavor [®] Resolute | p-Wert |
|----------------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------------|
| % endothelialisierte Stentfläche | 100±0 | 78,0±11,4 | 89,3±7,9 | 0,0114* ⁺ |

* Driver[®] vs. Xience V[®]; ⁺ Driver[®] vs. Endeavor[®] Resolute; [‡] Xience V[®] vs. Endeavor[®] Resolute

4.3 Klinische Daten

4.3.1 Patientendaten

Die für diese Arbeit eingeschlossenen 12 Patienten wiesen folgende Baseline Charakteristika auf:

Tabelle 15: Baseline Charakteristika der 12 Patienten

| | |
|-------------------------|-----|
| Geschlecht (m:f) | 9:3 |
| Ø Alter | 67 |
| Hypercholesterinämie, % | 67 |
| Hypertension, % | 92 |
| Diabetes, % | 42 |
| Aktive Raucher, % | 17 |

4.3.2 klinische OCT Daten nach 6 Monaten

Die humanen OCT Ergebnisse sechs Monate nach Stentimplantation (Tab. 16) ließen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Drug-eluting Stents erkennen.

Tabelle 16: Vergleich der humanen OCT Parameter der beiden DES 6 Monate nach Implantation

| | Xience V [®] | Endeavor [®] Resolute | p - Wert |
|--|-----------------------|-----------------------------------|----------|
| Lumenfläche, mm ² | 6,8±3,1 | 6,5±2,5 | 0,844 |
| Stentfläche, mm ² | 7,3±3,0 | 7,2±2,5 | 0,966 |
| Neointimafläche, mm ² | 0,5±0,1 | 0,7±0,3 | 0,076 |
| % Stenose | 8,5±6,7 | 11,0±6,6 | 0,531 |
| Neointimadicke über den Streben, mm | 0,07±0,03 | 0,09±0,04 | 0,342 |
| RUTSS Score | 0,28±0,16 | 0,20±0,20 | 0,440 |

* Driver[®] vs. Xience V[®]; + Driver[®] vs. Endeavor[®] Resolute; ‡ Xience V[®] vs. Endeavor[®] Resolute

4.4 Vergleich präklinischer und klinischer OCT Daten

4.4.1 DES nach 28 Tagen (präklinisch) und 6 Monaten (klinisch)

Beim 28 Tages - Vergleich der präklinischen mit den klinischen OCT Daten (Tab. 17 und 18) wiesen die DES keine signifikanten Unterschiede bezüglich der gemessenen Parameter auf. Der Anteil an unbedeckten Streben (RUTSS) fiel im Tiermodell nach 28 Tagen, sowohl beim Xience V[®] als auch beim Endeavor[®] Resolute, höher aus als bei den Patienten sechs Monate nach Stentimplantation.

Tabelle 17: Vergleich der präklinischen OCT Daten des **Xience V[®]** nach 28 Tagen mit den klinischen OCT Daten des **Xience V[®]** nach 6 Monaten

| | Präklinisch | Klinisch | p - Wert |
|--|-------------|-----------|----------|
| Lumenfläche, mm ² | 2,9±0,4 | 6,8±3,1 | 0,055 |
| Stentfläche, mm ² | 3,3±0,4 | 7,3±3,0 | 0,055 |
| Neointimafläche, mm ² | 0,37±0,2 | 0,5±0,1 | 0,200 |
| % Stenose | 10,8±6,7 | 8,5 ±6,7 | 0,337 |
| Neointimadicke über den Streben, mm | 0,07±0,04 | 0,07±0,03 | 0,522 |
| RUTSS Score | 0,45±0,17 | 0,28±0,16 | 0,150 |

* Driver[®] vs. Xience V[®]; + Driver[®] vs. Endeavor[®] Resolute; ‡ Xience V[®] vs. Endeavor[®] Resolute

Tabelle 18: Vergleich der präklinischen OCT Daten des **Endeavor[®] Resolute** nach 28 Tagen mit den klinischen OCT Daten des **Endeavor[®] Resolute** nach 6 Monaten

| | Präklinisch | Klinisch | p-Wert |
|--|-------------|-----------|--------|
| Lumenfläche, mm ² | 3,9±0,8 | 6,5±2,5 | 0,055 |
| Stentfläche, mm ² | 4,5±0,7 | 7,2±2,5 | 0,066 |
| Neointimafläche, mm ² | 0,65±0,3 | 0,7±0,3 | 0,689 |
| % Stenose | 14,5±7,6 | 11,0±6,6 | 0,298 |
| Neointimadicke über den Streben, mm | 0,10±0,05 | 0,09±0,04 | 0,810 |
| RUTSS Score | 0,32±0,22 | 0,20±0,20 | 0,575 |

* Driver[®] vs. Xience V[®]; + Driver[®] vs. Endeavor[®] Resolute; ‡ Xience V[®] vs. Endeavor[®] Resolute

Die Spread out vessel Graphiken beider DES zeigten zu diesem Zeitpunkt (Abb. 31), dass die höchste Anzahl an unbedeckten Streben im Kaninchen vor allem in den mittleren Stentbereichen, z.T. auch proximal lokalisiert waren. Beim Menschen hingegen ließen die Graphiken eine gleichmäßigere Verteilung über den gesamten Stent erkennen.

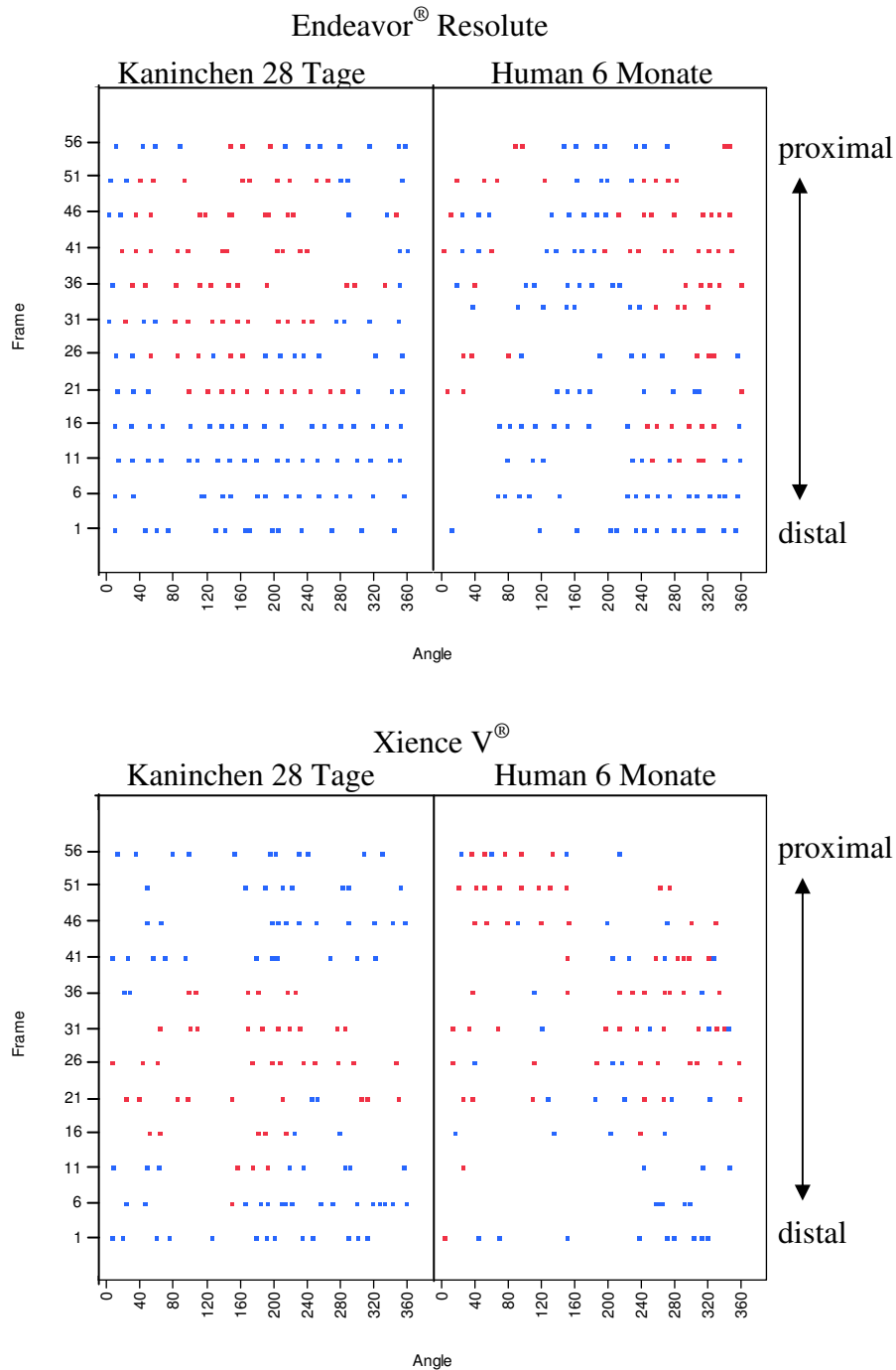


Abbildung 31: Spread out vessel Graphik eines Endeavor[®] Resolute Stents (obere Abb.) und eines Xience V[®] Stents (untere Abb.) nach 28 Tagen im Kaninchen und 6 Monaten im Menschen; rot = unbedeckte Streben, blau = bedeckte Streben

4.4.2 DES nach 42 Tagen (präklinisch) und 6 Monaten (klinisch)

Beim 42 Tages - Vergleich der präklinischen mit den klinischen OCT Daten (Tab. 19 und 20) wies nur der Endeavor[®] Resolute deutliche Differenzen bezüglich der Lumen- und Stentfläche auf. Des Weiteren zeigten die beiden DES im Tier ein signifikant stärkeres Neointimawachstum als im Vergleich zum Menschen.

Tabelle 19: Vergleich der präklinischen OCT Daten des **Xience V[®]** nach 42 Tagen mit den klinischen OCT Daten des **Xience V[®]** nach 6 Monaten

| | Präklinisch | Klinisch | p - Wert |
|--|-------------|-----------|---------------|
| Lumenfläche, mm ² | 2,9±0,1 | 6,8±3,1 | 0,055 |
| Stentfläche, mm ² | 3,6±0,1 | 7,3±3,0 | 0,066 |
| Neointimafläche, mm ² | 0,7±0,2 | 0,5±0,1 | 0,025* |
| % Stenose | 19,6±4,9 | 8,5 ±6,7 | 0,025* |
| Neointimadicke über den Streben, mm | 0,12±0,03 | 0,07±0,03 | 0,037* |
| RUTSS Score | 0,15±0,14 | 0,28±0,16 | 0,200 |

* Xience V[®] vs. Endeavor[®] Resolute

Tabelle 20: Vergleich der präklinischen OCT Daten des **Endeavor[®] Resolute** nach 42 Tagen mit den klinischen OCT Daten des **Endeavor[®] Resolute** nach 6 Monaten

| | Präklinisch | Klinisch | p-Wert |
|--|-------------|-----------|---------------|
| Lumenfläche, mm ² | 2,7±0,4 | 6,5±2,5 | 0,010* |
| Stentfläche, mm ² | 3,8±0,2 | 7,2±2,5 | 0,037* |
| Neointimafläche, mm ² | 1,1±0,5 | 0,7±0,3 | 0,078 |
| % Stenose | 29,5±11,4 | 11,0±6,6 | 0,004* |
| Neointimadicke über den Streben, mm | 0,19±0,09 | 0,09±0,04 | 0,010* |
| RUTSS Score | 0,09±0,11 | 0,20±0,20 | 0,199 |

* Xience V[®] vs. Endeavor[®] Resolute

Wie bereits erwähnt zeigten die Spread out vessel Graphiken der humanen Daten eine gleichmäßige Verteilung der unbedeckten Streben über den gesamten Stent. Die präklinischen Daten 42 Tage nach der Implantation (Abb. 32) ließen hingegen nur wenige freiliegende Streben im proximalen bzw. mittleren Abschnitt erkennen.

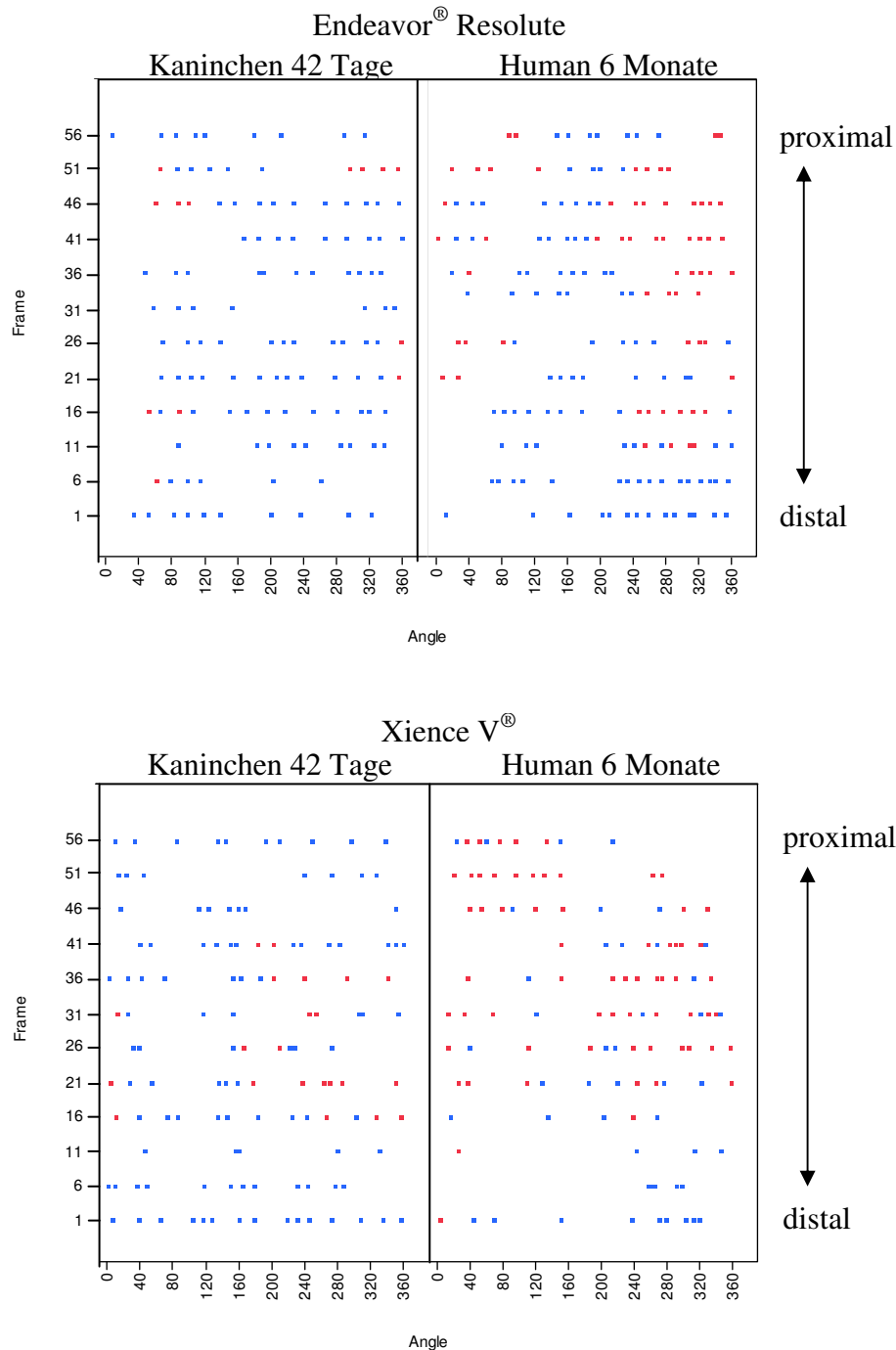


Abbildung 32: Spread out vessel Graphik eines Endeavor[®] Resolute Stents (obere Abb.) und eines Xience V[®] Stents (untere Abb.) nach 42 Tagen im Kaninchen und 6 Monaten im Menschen; rot = unbedeckte Streben, blau = bedeckte Streben

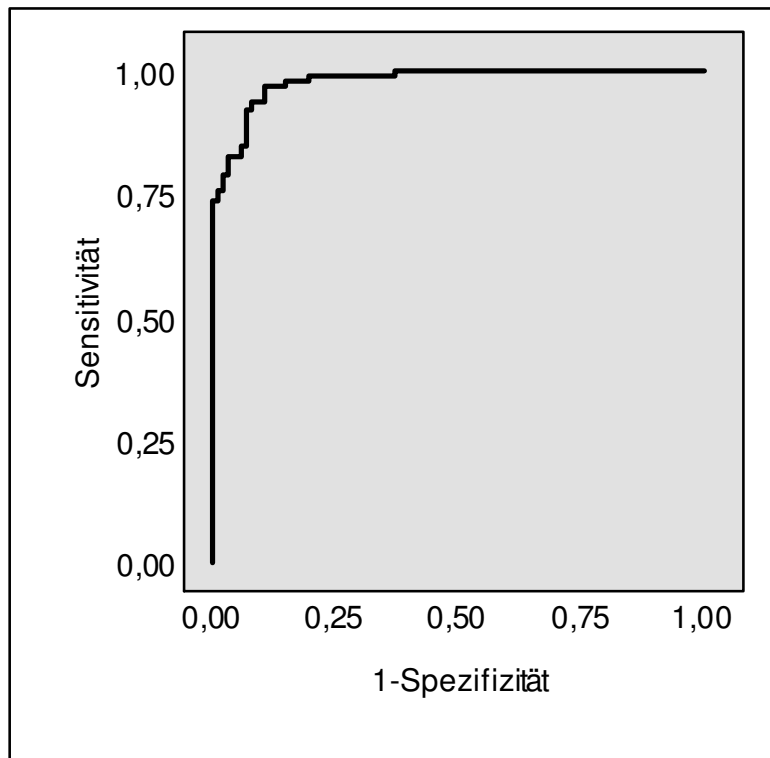
4.5 Ergebnisse der Gewebecharakterisierung mittels Graustufenmessung

Bei der Gewebecharakterisierung im Tiermodell waren bei den als „reif“ identifizierten Gewebearealen höhere Graumittelwerte messbar, als bei den als „unreif“ definierten Bereichen. Die zum Vergleich gemessenen Grauwerte der Streben und des Lumens zeigten die höchsten bzw. niedrigsten Mittelwerte (Tab. 21).

Tabelle 21: errechnete Graumittelwerte der einzelnen Gewebe

| | reifes Gewebe | unreifes Gewebe | Streben | Lumen |
|-----------------|------------------|--------------------|------------|---------|
| Graumittelwerte | 101,6±16,6 | 48,5±17,9 | 210,6±19,9 | 4,1±0,9 |

Die Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurve (Abb. 33) ließ eine sehr hohe Spezifität (85 %) sowie eine sehr hohe Sensitivität (98 %) mit einer Area Under the Curve (AUC) von 0,98 für die Graumittelwerte der reifen Gewebeareale erkennen. Der berechnete Cut-Off Wert lag bei 70,7. Dies bedeutet, dass es sich bei gemessenen Graumittelwerten über 70,7 mit einer 98 %-igen Sensitivität und einer 85 %-igen Spezifität um reifes neointimales Gewebe handelt.



Bewertung = 1 wird als positive Stufe verwendet.

Fläche unter Kurve = 0,97892

Abbildung 33: ROC-Kurve aus den Graumittelwerten der reifen Gewebeareale

Nach Auswertung der humanen OCT Frames zeigte sich, dass 34,8 % der Gewebeareale über den Stentstreben einen Graumittelwert aufwiesen, der über dem zuvor im Kaninchenmodell errechneten Cut-Off Wert von 70,7 lag. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei diesen Patienten 34,8 % der Streben von reifem neointimalem Gewebe bedeckt waren.

5. Diskussion

Das primäre Ziel dieser Studie war es, die Optische Kohärenztomographie als Untersuchungsmethode zur Beurteilung der Stenteinheilung im Menschen zu validieren. In diesem Zusammenhang wurden zwei unterschiedliche medikamentenbeschichtete Stents im atherosklerotischen Kaninchenmodell nach 28 und 42 Tagen mittels Optischer Kohärenztomographie und Histologie untersucht. Der nächste Schritt zielte darauf ab, anhand des Vergleichs der präklinischen mit den humanen OCT Daten, eine zeitliche Korrelation der Stenteinheilung zwischen Tiermodell und Mensch zu gewinnen. Darüber hinaus sollte eine neue Untersuchungsmethode (Graustufenmessung) etabliert werden, mit deren Hilfe die unterschiedlichen Gewebe im OCT charakterisiert und so der Fortschritt der Stenteinheilung im Menschen zuverlässig bestimmt werden kann.

Im Bezug auf diese Ziele, gab es folgende Beobachtungen:

1. die Gegenüberstellung der mittels Histologie und OCT erhobenen Daten zeigte eine ausgezeichnete Korrelation für alle gemessenen und berechneten Parameter.
2. der Vergleich der präklinischen OCT Daten mit den humanen OCT Daten ließ erkennen, dass die Stenteinheilung nach 28 Tagen im atherosklerotischen Kaninchenmodell der Situation im Menschen nach 6 Monaten nahe steht.
3. durch die Etablierung einer Graustufenmessung war es möglich, die einzelnen Gewebeareale mittels OCT als reif oder unreif zu charakterisieren und dadurch den Fortschritt der Stenteinheilung zuverlässig zu beurteilen.
4. die Untersuchung des Einheilungsverlaufs der beiden DES mittels Histologie und OCT im atherosklerotischen Kaninchenmodell zeigte eine ausgezeichnete Hemmung der Neointimaproliferation im Vergleich zum unbeschichteten Stent 28 Tage nach Implantation. Im weiteren Verlauf ließ diese beim Endeavor[®] Resolute nach, so dass die prozentuale Restenose nach 42 Tagen der des Driver[®] Stent entsprach.

5.1 Validierung des OCT als Untersuchungsmethode der Stenteinheilung

Die Optische Kohärenztomographie gilt als eine neue, viel versprechende Untersuchungsmethode zur Evaluierung der Stenteinheilung im Menschen und wird bereits mehrfach in humanen Studien angewendet (Barlis et al. 2008; Gutiérrez-Chico et al. 2011; Jang et al. 2005). Hinsichtlich der Interpretation der gewonnenen Informationen aus atherosklerotisch veränderten Gefäßen gibt es jedoch noch keine ausreichenden Erfahrungswerte.

Im Jahr 2008 zeigte eine Studie (Prati et al. 2008) anhand gesunder gestenteter Kaninchenkarotiden, dass eine ausgezeichnete Korrelation zwischen den histomorphometrischen und den im OCT gemessenen Parametern besteht. Eine weitere Studie (Murata et al. 2010), in der die Einheilung von Stents in gesunden Schweinekarotiden untersucht wurde, bestätigte schließlich diese Ergebnisse. Da der direkte Vergleich zwischen Histologie und OCT jedoch beide Male in gesunden Gefäßen erfolgte bleibt unbekannt, ob die Korrelationen auch dann noch so hervorragend sind, wenn das kohärente Licht nicht nur auf gesunde, sondern auch auf atherosklerotisch veränderte Gefäße trifft, wie sie in erster Linie im Menschen zu finden sind. Die unterschiedliche Dichte der einzelnen Gewebebestandteile in solchen humanen atherosklerotischen Läsionen (bestehend aus Plaqueablagerungen, Fibrinansammlungen, organisierten Thromben und ausgeprägten Entzündungsreaktionen), führen im OCT zu sehr heterogenen Signalen die eine Differenzierung der einzelnen Gefäßstrukturen und somit auch eine Beurteilung der Stenteinheilung deutlich erschweren (Nakano et al. 2012).

Aus diesem Grund war es ein Ziel dieser Arbeit, histomorphometrische Daten mit den entsprechenden OCT Daten zu vergleichen, um so die Optische Kohärenztomographie nun auch in atherosklerotisch veränderten Gefäßen zu validieren.

Nachdem hierfür 136 histologische Schnitte mit den entsprechenden OCT Frames korreliert und die gemessenen morphometrischen Parameter mittels partiellem Korrelationskoeffizienten und Bland-Altman-Plots untersucht werden konnten, zeigt sich auch im atherosklerotischen Kaninchenmodell, sowohl nach 28 als auch nach 42 Tagen, eine ausgezeichnete Korrelation zwischen Histologie und OCT.

Einzig der Anteil an unbedeckten Stentstreben fällt im OCT bei höheren RUTSS Score Werten (zwischen 0,4 und 0,9) etwas höher aus als in der Histologie. Dieser Umstand ist allerdings auf die geringe Auflösung des OCT zurückzuführen, welche eine Detektion von neointimalem Gewebe unterhalb der Auflösungsgrenze von 0,02 mm nicht zulässt (Nakano et al. 2012). Somit stellen sich im OCT bei frühen Untersuchungszeitpunkten, die durch eine geringe Neointimabildung und einen hohen RUTSS Score gekennzeichnet sind, mehr unbedeckte Stentstreben dar, als tatsächlich vorhanden sind. Da jedoch die Neointimadicke im weiteren Einheilungsverlauf kontinuierlich zunimmt, fällt der Anteil an falsch unbedeckt bewerteten Streben im OCT ab und weist somit zu späteren Zeitpunkten annähernd identische Werte zur Histologie auf.

Trotz dieser Abweichungen lässt der RUTSS Score einen stark positiven Korrelationskoeffizienten (+0,85) erkennen. Folglich stellt die Optische Kohärenztomographie eine zuverlässige Methode dar, um die Einheilungssituation von Stents in gesunden, aber auch in atherosklerotisch veränderten Gefäßen zu beurteilen.

5.2 Vergleich von präklinischen mit klinischen OCT Daten

Bereits 2003 zeigte eine Studie, dass die Einheilung von Drug-eluting Stents im Tier etwa sechs mal schneller verläuft als im Menschen (Virmani et al. 2003). Folglich ging man davon aus, dass die Stenteinheilung nach 28 Tagen im Tiermodell der Situation nach 6 Monaten im Menschen entspricht. Dabei gilt jedoch zu beachten, dass dieser Zeitpunkt anhand gesunder Tiere ermittelt wurde und keine direkte Gegenüberstellung, sondern nur ein indirekter Vergleich mit unselektierten humanen Autopsiepräparaten stattfand.

In diesem Zusammenhang muss auch erwähnt werden, dass die Stenteinheilung in atherosklerotisch veränderten Gefäßen aufgrund der Plaqueablagerungen, der vermehrten Ansammlung von Entzündungszellen und der verzögerten Endothelialisierung nachweislich langsamer von statten geht als in gesunden Gefäßen. Da ein Ziel dieser Arbeit die zeitliche Korrelation der Stenteinheilung zwischen Mensch und atherosklerotischem Kaninchenmodell darstellte, entschieden wir uns zusätzlich zu den bereits etablierten 28 Tagen im Tier, noch einen zweiten Zeitpunkt mit 42 Tagen anzuschließen.

Beim direkten Vergleich der präklinischen mit den klinischen OCT Daten zeigt sich schließlich, dass nahezu alle Parameter der 42-Tages-Gruppe, ausgenommen des RUTSS Scores, signifikante Unterschiede im Vergleich zum Menschen aufweisen. Im Gegensatz hierzu weicht kein Parameter der 28-Tages-Gruppe signifikant von den humanen Daten ab. Die höheren Lumen- und Stentflächewerte der Patienten gegenüber dem Tiermodell können dabei auf die Verwendung unterschiedlicher Stentdurchmesser zurückgeführt werden.

Des Weiteren zeigen die 28-Tages-Daten, dass sowohl der Xience V[®] als auch der Endeavor[®] Resolute trotz der fortgeschritteneren Neointimabildung und der größeren prozentualen Stenose im Tiermodell, eine höhere Anzahl freiliegender Stentstreben aufweisen als im Menschen. Dieser Umstand deutet auf eine heterogenere Einheilung beider Stents zu diesem Zeitpunkt im Tiermodell hin, die sich auch in den Spread out vessel Graphiken darstellen lässt. Darin zeigt sich, dass vor allem der mittlere Stentbereich eine hohe Anzahl freiliegender Streben aufweist, während beim Menschen eine gleichmäßigere Verteilung über den gesamten Stent zu erkennen ist. Als mögliche Ursache dieser heterogenen Einheilung nennt Finn et al. (2007a) eine höhere Medikamentenkonzentration in diesem Bereich aufgrund unterschiedlicher Strebendurchmesser oder auch malappositionierter Streben, die zu einer Stagnation des Blutflusses und somit zu einer lokal erhöhten Medikamentenkonzentration führen können.

Basierend auf diesen Ergebnissen kann man sagen, dass die Einheilung der beiden Stents nach 28 Tagen im atherosklerotischen Tiermodell, unabhängig vom aufgetragenen Medikament, der Situation im Menschen sechs Monate nach Implantation am nächsten kommt.

Jedoch gilt hierbei zu beachten, dass trotz der annähernd identischen morphometrischen Werte, der RUTSS Score im Tiermodell nach 28 Tagen höher und nach 42 Tagen geringer ausfällt als im Menschen. Bei der Gegenüberstellung eines atherosklerotischen Tiermodells mit dem Menschen, geht es aber in erster Linie um die Stenteinheilung und um die Abschätzung der notwendigen Dauer der dualen antithrombozytären Therapie. Deshalb ist es äußerst wichtig, dass die Anzahl der freiliegender Streben im präklinischen Modell auch der Anzahl im Menschen entspricht. Aus diesem Grund wäre zu überlegen, ob ein zusätzlicher Versuchszeitpunkt im Tiermodell zwischen 28 und 42 Tagen getestet werden sollte.

5.3 Gewebecharakterisierung mittels Graustufenmessung im OCT

Die Optische Kohärenztomographie stellt zurzeit eine gute Untersuchungsmethode dar, um die Einheilung von Stents im Bezug auf das Vorhandensein von freiliegenden Streben zu beurteilen. Jedoch bietet sie bisher keine Möglichkeit, die Zusammensetzung sowie den Reifegrad des neointimalen Gewebes genauer zu charakterisieren. So kann es vorkommen, dass Streben, welche von unreifem, gerinnungsförderndem Gewebe bedeckt sind als gut eingehilt beurteilt werden, aber in Wahrheit immer noch ein hohes Risiko für die Entstehung einer Stentthrombose darstellen.

Erste Versuche Gewebe mittels OCT zu charakterisieren wurden bereits 2010 unternommen (Templin et al. 2010). Durch die Gegenüberstellung von lichtmikroskopischen Bildern, Rasterelektronenmikroskopie und OCT Aufnahmen gelang es, eine optische Dichtemessung zur Detektion von Fibrin um die Stentstreben zu etablieren. Anhand der Relation von Gewebeintensität zur Strebenintensität konnte schließlich eine Aussage über das Vorhandensein von Fibrin getroffen werden. Nachdem in dieser Arbeit mehrere histologische Bilder mit den entsprechenden OCT Frames korreliert wurden fiel jedoch auf, dass die Intensität der Streben, unabhängig von der Art des luminal liegenden Gewebes oder der Lage der Lichtquelle des OCT Katheters, deutlich variiert. Aus diesem Grund war es ein Ziel dieser Arbeit, eine neue Methode zur Gewebecharakterisierung zu etablieren, welche unabhängig von der Intensität der Streben ist.

Nach Auswertung der einzelnen Gewebeareale im Tiermodell wurde anhand der Graumittelwerte eine ROC Kurve erstellt und damit ein Cut-Off Wert von 70,7 berechnet. Dies bedeutet, dass bei Graumittelwerten über 70,7 mit einer Sensitivität von 98 % und einer Spezifität von 85 % von „reifer“ Neointima ausgegangen werden kann.

In einem nächsten Schritt konnte dieser errechnete Cut-Off Wert auf die humanen OCT Frames angewendet werden. Dabei zeigt sich, dass knapp 35 % der untersuchten Areale über den Streben einen Wert über 70,7 aufwiesen. Folglich kann bei diesen Geweben von gesunder Neointima ausgegangen werden.

Neben der bisherigen Möglichkeit, die Stenteinheilung anhand des RUTSS Scores zu beurteilen, soll nun mit Hilfe der Graustufenmessung auch der Reifegrad und somit das Thromboserisiko des neu gebildeten Gewebes zuverlässig bestimmt

werden. Hierdurch könnte die notwendige Dauer der risikobehafteten dualen antithrombozytären Therapie nach einer Stentimplantation für jeden Patienten individuell angepasst werden.

Jedoch ist diese neue Technik auch mit Limitationen behaftet. So zeigte sich z.B. während den Messungen, dass die OCT Bilder von sehr guter Qualität sein müssen, um vergleichbare Graumittelwerte zu erhalten. Des Weiteren können aufgrund der noch zu geringen Auflösung des OCT, kleinere Ansammlungen von Entzündungszellen sowie Fibrin in der Neointima nicht eindeutig vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden. Aus diesem Grund ist eine Charakterisierung solch kleiner Gewebebestandteile nicht möglich. Da jedoch Bestrebungen bestehen, die Auflösung des OCT auf unter 1 μm zu erhöhen (Liu et al. 2011), könnte die Graustufenmessung in Verbindung mit dieser verbesserten OCT Technik zukünftig auch kleinere neointimale Bestandteile detektieren und charakterisieren.

5.4 Beurteilung der Stenteinheilung mittels Histologie und OCT im atherosklerotischen Kaninchenmodell

Wie bereits in anderen Publikationen erwähnt (Finn et al. 2007b; Nakazawa et al. 2011), zeigen die DES eine geringere Neointimabildung und somit auch eine geringere prozentuale Stenose als der unbeschichtete Driver[®] Stent. Dieses Verhalten ist auf die antiproliferative Wirkung der aufgetragenen Medikamente zurückzuführen, die einer überschießenden Neointimabildung in den ersten 28 Tagen nach der Implantation entgegenwirken. Allerdings kommt es dadurch auch zu einer erhöhten Anzahl an unbedeckten Stentstreben, zu einer deutlich verzögerten Endothelialisierung sowie zum vermehrten Auftreten von Fibrin im Bereich der Stentstreben. Das Resultat dieser verzögerten Einheilungstendenz der DES ist ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Stentthrombose (Joner et al. 2006). Aufgrund der geringen Neointimabildung, der hohen Anzahl an freiliegenden Stentstreben sowie des vermehrten Vorkommens von Fibrin, ist diese Gefahr beim Xience V[®] auch nach 42 Tagen noch gegeben. Des Weiteren zeigt sich in diesem Zusammenhang, dass der Endeavor[®] Resolute zu diesem Zeitpunkt genauso viel Neointima entwickelt wie der unbeschichtete Driver[®] Stent,

gleichzeitig aber auch mehr unbedeckte Streben erkennen lässt. Betrachtet man hierzu die hohen Standardabweichungen, so kann dieser Umstand auf ein exzentrisches Neointimawachstum und somit auf ein heterogenes Einheilungsverhalten des beschichteten Stents zurückgeführt werden.

Neben der antiproliferativen Wirkung der Medikamente nach 28 Tagen, zeigt sich anhand des signifikant erhöhten Inflammationscores des unbeschichteten Driver[®] auch der antiinflammatorische Effekt der DES nach 28 und 42 Tagen.

Die OCT Werte der morphometrischen Parameter zeigen sowohl nach 28 als auch nach 42 Tagen dieselben Tendenzen wie in der Histologie. Einzig der Anteil an unbedeckten Streben fällt im OCT nach 28 Tagen höher aus. Wie bereits erwähnt, ist diese Abweichung jedoch auf die geringe Auflösung des OCT zurückzuführen, die eine Detektion von neointimalem Gewebe unterhalb der Auflösungsgrenze von 0,02 mm nicht zulässt (Nakano et al. 2012). Da die Neointimadicke über den Streben bei allen drei Stents nach 42 Tagen zugenommen hat, fällt der Anteil an falsch unbedeckt bewerteten Streben im OCT nun geringer aus als nach 28 Tagen. Somit weist zu diesem späten Zeitpunkt jetzt auch der RUTSS Score annähernd identische Werte zur Histologie auf.

6. Zusammenfassung

Durch die Einführung medikamentenbeschichteter Stents (DES) konnte die hohe Restenoserate ihrer unbeschichteten Vorgänger (BMS) erfolgreich reduziert werden. Aufgrund der antiproliferativen Substanzen kam es jedoch auch zu einer deutlich verzögerten Gefäßheilung sowie zu einem gesteigerten Risiko der Stentthrombosebildung. Der daraus resultierende konventionelle Einsatz einer dualen antithrombozytären Medikation nach einer DES Implantation geht allerdings mit einer erhöhten Blutungsneigung einher und führt bei den Patienten oftmals zu Komplikationen. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, eine Untersuchungsmethode zu etablieren, mit der die Stenteinheilung zuverlässig beurteilt werden kann, um somit die Dauer einer dualen antithrombozytären Therapie für jeden Patienten individuell anzupassen.

Hierfür wurden 22 atherosklerotischen Kaninchen abwechselnd 15 Xience V[®] (DES), 15 Endeavor[®] Resolute (DES) und 14 Driver[®] (BMS) Stents in die externen Iliakalarterien implantiert. Nach 28 bzw. 42 Tagen wurden die Gefäße mittels Optischer Kohärenztomographie (OCT) dargestellt, explantiert und histologisch sowie rasterelektronenmikroskopisch anhand von speziellen Einheilungsparametern analysiert. Danach erfolgte eine Gegenüberstellung der Daten aus der Histologie und des bildgebenden Verfahrens, um so die Optische Kohärenztomographie als Untersuchungsmethode der Stenteinheilung zu validieren. Nach der Methodenvolidierung wurden in einem weiteren Schritt die präklinischen OCT Daten mit klinisch erhobenen Daten verglichen. Zweck war es, den Zeitpunkt im Tiermodell entsprechend der humanen Befunde 6 Monate nach Stentimplantation anzupassen. Zum Schluss wurde anhand der präklinischen OCT Bilder eine Graustufenmessung zur Gewebecharakterisierung etabliert und diese anschließend auf humane OCT Aufnahmen übertragen.

Sowohl 28 als auch 42 Tage nach der Stentimplantation ließ sich eine ausgezeichnete Korrelation von Histologie und OCT im atherosklerotischen Tiermodell erkennen. Hinsichtlich der morphometrischen Parameter kam der 28 Tageszeitpunkt der humanen Situation 6 Monate nach Stentimplantation zwar am nächsten, jedoch war die Einheilung noch etwas verzögert, so dass der optimale Untersuchungszeitpunkt im Tiermodell zwischen 28 und 42 Tagen liegt.

Mit Hilfe der Graustufenmessung ist es in dieser Arbeit gelungen, die Beschaffenheit und den Reifegrad des neu gebildeten Gewebes zu charakterisieren. Die Auflösungskraft reichte allerdings nicht aus um einzelne zelluläre Komponente oder Fibrin zu detektieren.

Eine Verbesserung der Auflösungskraft in Kombination mit der Graustufenmessung könnte zukünftig dazu führen, dass die Stenteinheilung im Menschen verlässlich bestimmt und somit die Dauer der dualen antithrombozytären Therapie individuell angepasst werden kann.

7. Summary

The introduction of drug eluting stents highly reduced the restenosis rates of their uncoated predecessors. However, the antiproliferative potential of their drugs significantly delayed vascular healing and increased the risk of thrombus formation. Therefore, patients receiving drug eluting stents are submitted to prolonged dual antithrombotic therapy and concomitantly are at higher bleeding risk along with other complications. Under these circumstances the aim of this study was to establish a new diagnostic tool to characterize the progress of stent healing and to reliably judge the optimal time point for discontinuation of dual antithrombotic therapy.

For this purpose, 15 Xience V[®], 15 Endeavor[®] Resolute and 14 Driver[®] bare metal stents were alternately implanted into the external iliac arteries of 22 atherosclerotic rabbits. Vessels were imaged 28 and 42 days later by optical coherence tomography (OCT), explanted and evaluated by histology and scanning electron microscopy (SEM) based on special healing parameters. To validate OCT as an examination method for stent healing in atherosclerotic vessels, the OCT images were matched to their corresponding histological cross sections followed by data correlation. In a further step, the preclinical acquired OCT data was compared the clinical data in order to adjust the time point of stent healing in the animal model to the human situation 6 months after stent implantation. After this adjustment, OCT-based tissue characterization was established by grey scale measurement and translated to human OCT frames.

Preclinical OCT-acquired morphometric data showed an overall significant correlation for both time points (28 and 42 days) after stent implantation when compared to the histological data. Especially the data assessed at 28 days were close to human OCT data 6 months following implantation. However, at 28 days, vascular healing was delayed compared to the human 6 months data, indicating that an optimal time point for comparing animal to human stent healing data lies between 28 and 42 days in the atherosclerotic rabbit model.

Grey scale measurement as a means for tissue characterization was for the first time established in this work and was able to distinguish between mature and immature neointimal tissue. Yet, due to the still low resolution of the current OCT system, the detection of cellular components or fibrin deposition was not possible. With improvement of the systems resolution, this new technique, in combination

with the grey scale measurement, could represent a reliable method for the evaluation of stent healing in humans and thereby contribute to customize the optimal duration of the dual antithrombotic therapy for each patient.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische Darstellung der Atherosklerosestadien, modifiziert nach Virmani et al. 2001

Abbildung 2: angiographische Darstellung einer hochgradig stenosierten Koronararterie im Menschen

Abbildung 3: OCT Bild (Frame) eines gestenteten Gefäßes mit Neointimabildung

Abbildung 4: schematische Darstellung der Gefäßreaktion nach alleiniger Ballonangioplastie und Stentimplantation (modifiziert nach Rajagopal und Rockson 2003)

Abbildung 5: Photographie eines 20 mm langen, expandierten Stentgerüsts

Abbildung 6: schematische Darstellung einer Stentimplantation, modifiziert nach Boston Scientific 2012; Bildquellen: Images provided courtesy of Boston Scientific. © 2012 Boston Scientific Corporation or its affiliates

Abbildung 7: schematische Darstellung des Aufbaus medikamentenbeschichteter Stents (Querschnitt durch eine Strebe)

Abbildung 8: schematische Darstellung des Einheilungsverlaufes eines Stents in einem atherosklerotisch veränderten Gefäß, modifiziert nach Virmani et al. 2003; gedruckt mit Genehmigung der BMJ Publishing Group Ltd.

Abbildung 9: Fließdiagramm des Versuchablaufes

Abbildung 10: Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs mit Euthanasie der Tiere 28 bzw. 42 Tage nach Stentimplantation

Abbildung 11: Legen der Gefäßschleuse in die Arteria carotis communis als Vorbereitung zur Denudation

Abbildung 12: angiographische Aufnahmen zur Darstellung beider externer Iliakalarterien

Abbildung 13: angiographische Darstellung beider externer Iliakalarterien vor und nach Stentimplantation

Abbildung 14: angiographische Darstellung beider externer Iliakalarterien direkt nach Stentimplantation und zum Zeitpunkt der Euthanasie

Abbildung 15: Vorbereitungen für die OCT Untersuchung zum Versuchsende

Abbildung 16: Darstellung eines gestenteten Gefäßes als Querschnitt und als Längsschnitt während der OCT Untersuchung

Abbildung 17: ein in MMA eingebettetes gestentetes Gefäß mit den neun Schnittebenen

Abbildung 18: Movat-Pentachrom gefärbte histologische Schnittpräparate

Abbildung 19: Movat-Pentachrom gefärbte histologische Schnittpräparate zur Darstellung der Messung der Plaqueablagerungen und Mineralisierungen

Abbildung 20: H&E gefärbte Schnittpräparate zur Beurteilung der Einheilungsparameter

Abbildung 21: mit der OCT System Analysis Software ausgemessener OCT Frame

Abbildung 22: Gegenüberstellung eines Movat-Pentachrom gefärbten histologischen Schnittes mit dem entsprechenden OCT Frame

Abbildung 23: Spread out vessel Graphik eines Drug-eluting Stents

Abbildung 24: Bewertung der Endothelialisierung 28 Tage nach Stentimplantation anhand rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen (x15 und x600)

Abbildung 25: Korrelation von Histologie mit OCT zur Messung der Graumittelwerte

Abbildung 26: Gegenüberstellung von H&E-gefärbten histologischen Vergrößerungen (x 20) mit den entsprechenden, in Graustufen umgewandelten OCT Ausschnitten

Abbildung 27: graphischer Verlauf der Plasma-Cholesterinwerte mit einfachen Standardabweichungen

Abbildung 28: makroskopisch sichtbare Lipämie zum Zeitpunkt der Euthanasie 42 Tage nach Stentimplantation

Abbildung 29: graphische Darstellung der Intra-individuellen Korrelationen zwischen den Parametern der Histologie und des OCT

Abbildung 30: Bland-Altman-Plots zur graphischen Darstellung der individuellen Abweichungen zwischen den Parametern der Histologie und des OCT

Abbildung 31: Spread out vessel Graphik eines Endeavor[®] Resolute Stents und eines Xience V[®] Stents nach 28 Tagen im Kaninchen und 6 Monaten im Menschen

Abbildung 32: Spread out vessel Graphik eines Endeavor[®] Resolute Stents und eines Xience V[®] Stents nach 42 Tagen im Kaninchen und 6 Monaten im Menschen

Abbildung 33: ROC-Kurve aus den Graumittelwerten der reifen Gewebeareale

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: MMA-Einbettprotokoll nach Milz und Putz (1994)

Tabelle 2: Movat-Pentachrom Färbeprotokoll

Tabelle 3: H&E Färbeprotokoll

Tabelle 4: Score-Tabelle zur Beurteilung der Inflammation (modifiziert nach Carter et al. 2004)

Tabelle 5: Protokoll von CVPPath Institute, Inc., Gaithersburg, USA zur Aufbereitung der REM Probe

Tabelle 6: Plasmaparameter der Kaninchen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Tabelle 7: Vergleich der histomorphometrischen Parameter der einzelnen Stents 28 Tage nach Implantation

Tabelle 8: Vergleich der Einheilungsparameter der einzelnen Stents 28 Tage nach Implantation

Tabelle 9: Vergleich der histomorphometrischen Parameter der einzelnen Stents 42 Tage nach Implantation

Tabelle 10: Vergleich der Einheilungsparameter der einzelnen Stents 42 Tage nach Implantation

Tabelle 11: Vergleich der OCT Parameter der einzelnen Stents 28 Tage nach Implantation

Tabelle 12: Vergleich der OCT Parameter der einzelnen Stents 42 Tage nach Implantation

Tabelle 13: Korrelationskoeffizienten der gemessenen und berechneten Parameter

Tabelle 14: Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung 28 Tage nach Stentimplantation

Tabelle 15: Baseline Charakteristika der 12 Patienten

Tabelle 16: Vergleich der humanen OCT Parameter der beiden DES 6 Monate nach Implantation

Tabelle 17: Vergleich der präklinischen OCT Daten des Xience V[®] nach 28 Tagen mit den klinischen OCT Daten des Xience V[®] nach 6 Monaten

Tabelle 18: Vergleich der präklinischen OCT Daten des Endeavor[®] Resolute nach 28 Tagen mit den klinischen OCT Daten des Endeavor[®] Resolute nach 6 Monaten

Tabelle 19: Vergleich der präklinischen OCT Daten des Xience V[®] nach 42 Tagen mit den klinischen OCT Daten des Xience V[®] nach 6 Monaten

Tabelle 20: Vergleich der präklinischen OCT Daten des Endeavor[®] Resolute nach 42 Tagen mit den klinischen OCT Daten des Endeavor[®] Resolute nach 6 Monaten

Tabelle 21: errechnete Graumittelwerte der einzelnen Gewebe

10. Literaturverzeichnis

- Anderson, T. J. (1999). Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *Journal of the American College of Cardiology*, 34(3), 631–638.
- Arnold-Gloor, S., & Niemand, H. G. (Suter, P. F., Ed.) (2006). *Praktikum der Hundeklinik* (pp. 566-582). Stuttgart: Parey.
- Badimon, L. (2001). Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models. *Thrombosis and haemostasis*, 86(1), 356–365.
- Baer, F., & Rosenkranz, S. (2009). Koronare Herzkrankheit und akutes Koronarsyndrom. In E. Erdmann (Ed.), *Klinische Kardiologie. Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße* (7th ed., pp. 13–73). Heidelberg: Springer.
- Balletshofer, B. M., & Haasis, R. (2006). *Herz und Gefäße* (pp. 1-28). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Barlis, P., Serruys, P. W., DeVries, A., & Regar, E. (2008). Optical coherence tomography assessment of vulnerable plaque rupture: predilection for the plaque 'shoulder'. *European Heart Journal*, 29(16), 2023.
- Bauters, C., Meurice, T., Hamon, M., McFadden, E., Lablanche, J. M., & Bertrand, M. E. (1996). Mechanisms and prevention of restenosis: from experimental models to clinical practice. *Cardiovascular research*, 31(6), 835–846.
- Benzer, W. (2009). Perkutane transluminale koronare Intervention. In R. Pokan, W. Benzer, H. Gabriel, P. Hofmann, E. Kunschitz, K. Mayr, et al. (Eds.), *Kompendium der kardiologischen Prävention und Rehabilitation* (pp. 297–305). Wien; New York, NY: Springer.
- Bestehorn, H.-P., & Roskamm, H. (2004). Klinik der koronaren Herzerkrankung I: Stabile Angina pectoris, stumme Myokardischämie. In H. Roskamm, F.-J. Neumann, D. Kalusche, & H.-P. Bestehorn (Eds.), *Herzkrankheiten. Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie; 138 Tab* (5th ed., pp. 463–497). Berlin; Heidelberg [u.a.]: Springer.
- Beubler, E. (2011). *Kompendium der Pharmakologie: Gebräuchliche Arzneimittel in der Praxis* (3. überarb. und erw., pp. 107-119). Wien; [u.a.]: Springer.
- Bland, J. M., Altman, D. G. (1995). Calculation correlation coefficients with repeated observations: Part 1-correlation within subjects. *BMJ*. 310 (6977), 446
- Bland, J. M., Altman, D. G. (2007). Agreement between methods of measurement with multiple observations per individual. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*. 17 (4),571-582.

- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U. & Moch, H. (2008). *Lehrbuch Pathologie* (4. Aufl., pp. 495-525). München: Urban & Fischer in Elsevier.
- Bonetti, P. O., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(2), 168–175.
- Bonzel, T., & Hamm, C. W. (2009). *Leitfaden Herzkatheter* (pp.15-37; 91-107). Berlin: Steinkopff.
- Boston Scientific (2012): Angioplasty and Stent Implantation.
URL:<http://www.bostonscientific.com/lifebeat-online/cardiac-procedures/angioplasty-and-stents.html>. Stand: 13.08.2012
- Bühling, K. J. (2008). Grundlagen der Pathologie des Kreislaufes. In K. J. Bühling, J. Lepenies, & K. Witt (Eds.), *Intensivkurs: Allgemeine und Spezielle Pathologie* (4th ed., p. 161). München: Urban & Fischer in Elsevier.
- Bühling, K. J., Lepenies, J., & Witt, K. (Eds.) (2008). *Intensivkurs: Allgemeine und Spezielle Pathologie* (4. Aufl., pp. 161-203). München: Urban & Fischer in Elsevier.
- Burke, A. P., Farb, A., Malcom, G. T., Liang, Y., Smialek, J., & Virmani, R. (1998). Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women. *Circulation*, 97(21), 2110–2116.
- Burke, A. P., Farb, A., Kolodgie, F. D., Narula, J., & Virmani, R. (2002). Atherosclerotic plaque morphology and coronary thrombi. *Journal of Nuclear Cardiology*, 9(1), 95–103.
- Carter, A., Farb, A., Gould, K., Taylor, A., & Virmani, R. (1999). The Degree of Neointimal Formation after Stent Placement in Atherosclerotic Rabbit Iliac Arteries is Dependent on the Underlying Plaque. *Cardiovascular Pathology*, 8(2), 73–80.
- Carter, A., Aggarwal, M., Kopia, G. A., Tio, F., Tsao, P. S., Kolata, R., Yeung, A. C., Llanos, G., Dooley, J., Falotico, R. (2004). Long-term effects of polymer-based, slow-release, sirolimus-eluting stents in a porcine coronary model. *Cardiovascular Research*, 63(4), 617– 624
- Celermajer, D. S., Sorensen, K. E., Gooch, V. M., Spiegelhalter, D. J., Miller, O. I., Sullivan, I. D., et al. (1992). Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 340(8828), 1111–1115.
- Colombo, A., Drzewiecki, J., Banning, A., Grube, E., Hauptmann, K., Silber, S., et al. (2003). Randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for coronary artery lesions. *Circulation*, 108(7), 788–794.
- Cullen, P., Baetta, R., Bellosta, S., Bernini, F., Chinetti, G., Cignarella, A., et al. (2003). Rupture of the atherosclerotic plaque: does a good animal model exist? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(4), 535–542.

- Daemen, J., & Serruys, P. W. (2007). Drug-eluting stent update 2007: part I. A survey of current and future generation drug-eluting stents: meaningful advances or more of the same? *Circulation*, 116(3), 316–328.
- Dahme, E., & Weiss, E. (Dahme, E., Ed.) (2007). *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere* (pp. 1-33). Stuttgart: Enke.
- Eberli, F., Windecker, S., & Meier, B. (2001). Angioplastieverfahren. In V. Hombach (Ed.), *Interventionelle Kardiologie, Angiologie und Kardiovaskularchirurgie. Technik, Klinik, Therapie* (pp. 91–127). Stuttgart: Schattauer.
- Elezi, S., Kastrati, A., Neumann, F. J., Hadamitzky, M., Dirschinger, J., & Schömig, A. (1998). Vessel size and long-term outcome after coronary stent placement. *Circulation*, 98(18), 1875–1880.
- Erdmann, E. (Ed.) (2009). *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße* (7. vollst. überarb. und aktualisierte Aufl., pp. 13-73). Heidelberg: Springer.
- Escaned, J., & Serruys, P. W. (Eds.) (2010). *Coronary Stenosis, Imaging, Structure and Histology* (pp. 219-232). Toulouse: Europa Edition.
- Eskandari, M. K., Morasch, M. D., Pearce, W. H., & Yao, J. S. T. (Eds.) (2011). *Endovascular technology: Modern Trends in Vascular Surgery* (pp. 53-71). Shelton: PMPH-USA.
- Faggiotto, A., Ross, R., & Harker, L. (1984). Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 4(4), 323–340.
- Fan, J., Shimoyamada, H., Sun, H., Marcovina, S., Honda, K., & Watanabe, T. (2001). Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein(a) develop more extensive atherosclerotic lesions in response to a cholesterol-rich diet. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21(1), 88–94.
- Farb, A., Sangiorgi, G., Carter, A. J., Walley, V. M., Edwards, W. D., Schwartz, R. S., & Virmani, R. (1999). Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation*, 99(1), 44–52.
- Farb, A., Heller, P. F., Shroff, S., Cheng, L., Kolodgie, F. D., Carter, A. J., et al. (2001). Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. *Circulation*, 104(4), 473–479.
- Farb, A., Weber, D., Kolodgie, F. D., Burke, A., & Virmani, R. (2002). Morphological Predictors of Restenosis After Coronary Stenting in Humans. *Circulation*, 105(25), 2974–2980.

- FDA = US Food and Drug Administration (2008): Guidance for Industry: Coronary Drug-Eluting Stents – Nonclinical and Clinical Studies. URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072193.pdf>. Stand: 08.08.2012
- Fingerle, J., Au, Y. P., Clowes, A. W., & Reidy, M. A. (1990). Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 10(6), 1082–1087.
- Finking, G., & Hanke, H. (1997). Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research. *Atherosclerosis*, 135(1), 1–7.
- Finn, A. V., Gold, H. K., Tang, A., Weber, D. K., Wight, T. N., Clermont, A., et al. (2002). A novel rat model of carotid artery stenting for the understanding of restenosis in metabolic diseases. *Journal of vascular research*, 39(5), 414–425.
- Finn, A. V., Joner, M., Nakazawa, G., Kolodgie, F., Newell, J., John, M. C., et al. (2007a). Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation*, 115(18), 2435–2441.
- Finn, A. V., Nakazawa, G., Joner, M., Kolodgie, F. D., Mont, E. K., Gold, H. K., & Virmani, R. (2007b). Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(7), 1500–1510.
- Fischman, D. L., Leon, M. B., Baim, D. S., Schatz, R. A., Savage, M. P., Penn, I., et al. (1994). A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *The New England journal of medicine*, 331(8), 496–501.
- Fowler, S. D., Gasque-Carter, P. D., Pattillo-Adkisson, E., Sasiela, W. J., & Xenachis, D. N. (1991). Cellular models of atherosclerosis in the young. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 623, 60–69.
- Geary, R. L., Williams, J. K., Golden, D., Brown, D. G., Benjamin, M. E., & Adams, M. R. (1996). Time course of cellular proliferation, intimal hyperplasia, and remodeling following angioplasty in monkeys with established atherosclerosis. A nonhuman primate model of restenosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 16(1), 34–43.
- Greenland, P., Knoll, M. D., Stamler, J., Neaton, J. D., Dyer, A. R., Garside, D. B., & Wilson, P. W. (2003). Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 290(7), 891–897.
- Grewe, P. H.; Deneke, T.; Machraoui, A.; Barmeyer, J.; Müller, K. M. (2000). Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. *Journal of the American College of Cardiology*, 35(1), 157–163.

- Grube, E. (2002). Intracoronary Imaging With Optical Coherence Tomography: A New High-Resolution Technology Providing Striking Visualization in the Coronary Artery. *Circulation*, 106(18), 2409–2410.
- Gruntzig, A. (1978). Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet*, 1(8058), 263.
- Guba, M., Breitenbuch, P. von, Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., et al. (2002). Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature medicine*, 8(2), 128–135.
- Gutiérrez-Chico, J. L., van Geuns, R. J., Regar, E., van der Giessen, W. J., Kelbæk, H., Saunamäki, K., et al. (2011). Tissue coverage of a hydrophilic polymer-coated zotarolimus-eluting stent vs. a fluoropolymer-coated everolimus-eluting stent at 13-month follow-up: an optical coherence tomography substudy from the RESOLUTE All Comers trial. *European heart journal*, 32(19), 2454–2463.
- Gyöngyösi, M., Fröhlich, G., Garamvögyi, R., Glogar, H. D., Heinisch, B., Hevesi, A., et al. (2004). Intrakoronare Stents: Der Weg von der Fabrik bis in die menschlichen Koronararterien – Präklinische Evaluierung der Koronarstents. *J Kardiologie*, 11(12), 515–521.
- Heller, E. A., & Dangas, G. D. (2010). Coronary Artery Stenting. In P. P. Toth & C. P. Cannon (Eds.), *Comprehensive cardiovascular medicine in the primary care setting* (pp. 243–263). New York; Dordrecht; Heidelberg [etc.]: Human Press.
- Hirshfeld, J. W., Schwartz, J. S., Jugo, R., MacDonald, R. G., Goldberg, S., Savage, M. P., et al. (1991). Restenosis after coronary angioplasty: a multivariate statistical model to relate lesion and procedure variables to restenosis. The M-HEART Investigators. *Journal of the American College of Cardiology*, 18(3), 647–656.
- Holmes, D. R. (2001). In-stent restenosis. *Reviews in cardiovascular medicine*, 2(3), 115–119.
- Holmes, D. R., Leon, M. B., Moses, J. W., Popma, J. J., Cutlip, D., Fitzgerald, P. J., et al. (2004). Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimus-eluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis. *Circulation*, 109(5), 634–640.
- Hombach, V. (Ed.) (2001). *Interventionelle Kardiologie, Angiologie und Kardiovaskularchirurgie: Technik, Klinik, Therapie* (pp. 91-127). Stuttgart: Schattauer.
- Hrynchak, P., & Simpson, T. (2000). Optical coherence tomography: an introduction to the technique and its use. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry*, 77(7), 347–356.

- Jang, I.-K., Bouma, B. E., Kang, D.-H., Park, S.-J., Park, S.-W., Seung, K.-B., et al. (2002). Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(4), 604–609.
- Jang, I.-K., Tearney, G. J., MacNeill, B., Takano, M., Moselewski, F., Iftima, N., et al. (2005). In vivo characterization of coronary atherosclerotic plaque by use of optical coherence tomography. *Circulation*, 111(12), 1551–1555.
- Johnson, M. (2005). Hyperlipidemia Disorders in Dogs. *Compend Contin Educ Pract Vet*, 27(5), 361–370.
- Joner, M., Finn, A. V., Farb, A., Mont, E. K., Kolodgie, F. D., Ladich, E., et al. (2006). Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(1), 193–202.
- Karas, S. P., Gravanis, M. B., Santoian, E. C., Robinson, K. A., Anderberg, K. A., & King, S. B. (1992). Coronary intimal proliferation after balloon injury and stenting in swine: an animal model of restenosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 20(2), 467–474.
- Kastrati, A., Schömig, A., Elezi, S., Schühlen, H., Dirschinger, J., Hadamitzky, M., et al. (1997). Predictive Factors of Restenosis After Coronary Stent Placement. *Journal of the American College of Cardiology*, 30, 1428–1436.
- Koletsky, S. (1973). Obese spontaneously hypertensive rats--a model for study of atherosclerosis. *Experimental and molecular pathology*, 19(1), 53–60.
- Kolodgie, F. D., Katocs, A. S., Largis, E. E., Wrenn, S. M., Cornhill, J. F., Herderick, E. E., et al. (1996). Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 16(12), 1454–1464.
- Kondo, T., & Watanabe, Y. (1975). A heritable hyperlipemic rabbit. *Jikken dobutsu. Experimental animals*, 24(3), 89–94.
- Kritchevsky, D. (1995). Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history. *The Journal of nutrition*, 125(3 Suppl), 589S-593S.
- Kume, T., Akasaka, T., Kawamoto, T., Watanabe, N., Toyota, E., Neishi, Y., et al. (2005). Assessment of coronary intima-media thickness by optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 69(8), 903–907.

- Kume, T., Akasaka, T., Kawamoto, T., Ogasawara, Y., Watanabe, N., Toyota, E., et al. (2006a). Assessment of coronary arterial thrombus by optical coherence tomography. *The American journal of cardiology*, 97(12), 1713–1717.
- Kume, T., Akasaka, T., Kawamoto, T., Watanabe, N., Toyota, E., Neishi, Y., et al. (2006b). Assessment of coronary arterial plaque by optical coherence tomography. *The American journal of cardiology*, 97(8), 1172–1175.
- Lafont, A., & Faxon, D. (1998). Why do animal models of post-angioplasty restenosis sometimes poorly predict the outcome of clinical trials? *Cardiovascular research*, 39(1), 50–59.
- Lagerqvist, B., James, S. K., Stenestrand, U., Lindbäck, J., Nilsson, T., & Wallentin, L. (2007). Long-term outcomes with drug-eluting stents versus bare-metal stents in Sweden. *The New England journal of medicine*, 356(10), 1009–1019.
- Lapp, H., & Krakau, I. (2009). *Das Herzkatheterbuch: Diagnostische und interventionelle Kathetertechniken* (3. vollst. überarb. und erw., pp. 294-318). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135–1143.
- Liu, L., Gardecki, J. A., Nadkarni, S. K., Toussaint, J. D., Yagi, Y., Bouma, B. E., & Tearney, G. J. (2011). Imaging the subcellular structure of human coronary atherosclerosis using micro-optical coherence tomography. *Nature medicine*, 17(8), 1010–1014.
- Lloyd-Jones, D. M., Larson, M. G., Beiser, A., & Levy, D. (1999). Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet*, 353(9147), 89–92.
- Losordo, D. W., Isner, J. M., & Diaz-Sandoval, L. (2003). Endothelial Recovery: The Next Target in Restenosis Prevention. *Circulation*, 107(21), 2635–2637.
- Lowe, H. C., James, B., & Khachigian, L. M. (2005). A novel model of in-stent restenosis: rat aortic stenting. *Heart (British Cardiac Society)*, 91(3), 393–395.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801), 233–241.
- Manfrini, O., Mont, E., Leone, O., Arbustini, E., Eusebi, V., Virmani, R., & Bugiardini, R. (2006). Sources of error and interpretation of plaque morphology by optical coherence tomography. *The American journal of cardiology*, 98(2), 156–159.
- Masuda, J., & Ross, R. (1990a). Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 10(2), 164–177.

- Masuda, J., & Ross, R. (1990b). Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 10(2), 178–187.
- Meurer, D. G., & Wolf, S. (2007). *Allgemeine Pathologie: Kompendium für die Veterinärmedizin : mit 32 Tabellen* (2. neu bearb. und erw., pp. 62-89). Stuttgart [u.a.]: Schattauer.
- Mezdour, H., Jones, R., Dengremont, C., Castro, G., & Maeda, N. (1997). Hepatic lipase deficiency increases plasma cholesterol but reduces susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of biological chemistry*, 272(21), 13570–13575.
- Middeke, M. (2002). *Herzinfarkt: Was Sie jetzt wissen sollten ; alles über Behandlung und Rehabilitation ; bewusste Ernährung, gezielte Entspannung, richtige Bewegung ; so schützen Sie Ihr Herz* (2. Aufl., pp. 146-159). Stuttgart: TRIAS.
- Milz, S.; Putz, R. (1994). Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. *J Anat*, 185:103-110.
- Moghadasian, M. H., Frohlich, J. J., & McManus, B. M. (2001). Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 81(9), 1173–1183.
- Mondy, J. S., Williams, J. K., Adams, M. R., Dean, R. H., & Geary, R. L. (1997). Structural determinants of lumen narrowing after angioplasty in atherosclerotic nonhuman primates. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*, 26(5), 875–883.
- Mörl, H., Haders, P., & Fallois, J. von (1998). *Koronare Herzkrankheiten: Diagnostik und Therapie in der Praxis* (pp.1-12). Berlin; New York: de Gruyter.
- Murata, A., Wallace-Bradley, D., Tellez, A., Alviar, C., Aboodi, M., Sheehy, A., et al. (2010). Accuracy of optical coherence tomography in the evaluation of neointimal coverage after stent implantation. *JACC. Cardiovascular imaging*, 3(1), 76–84.
- Nakano, M., Vorpahl, M., Otsuka, F., Taniwaki, M., Yazdani, S. K., Finn, A. V., et al. (2012). Ex vivo assessment of vascular response to coronary stents by optical frequency domain imaging. *JACC. Cardiovascular imaging*, 5(1), 71–82.
- Nakazawa, G., Nakano, M., Otsuka, F., Wilcox, J. N., Melder, R., Pruitt, S., et al. (2011). Evaluation of polymer-based comparator drug-eluting stents using a rabbit model of iliac artery atherosclerosis. *Circulation. Cardiovascular interventions*, 4(1), 38–46.
- Nieves, G., Serruys, P. W., Macaya, C., & Regar, E. (2010). Optical Coherence Tomography in the study of coronary stenosis. In J. Escaned & P. W. Serruys (Eds.), *Coronary Stenosis, Imaging, Structure and Histology* (pp. 219–232). Toulouse: Europa Edition.

- Nobuyoshi, M., Kimura, T., Nosaka, H., Mioka, S., Ueno, K., Yokoi, H., et al. (1988). Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 12(3), 616–623.
- Plötz, H. (2007). *Kleine Arzneimittellehre für Fachberufe im Gesundheitswesen* (5. aktualisierte und erw., pp. 121-141). Heidelberg: Springer Medizin.
- Pokan, R., Benzer, W., Gabriel, H., Hofmann, P., Kunschitz, E., & Mayr, K., et al. (Eds.) (2009). *Kompendium der kardiologischen Prävention und Rehabilitation* (pp. 297-305). Wien; New York, NY: Springer.
- Poon, M., Marx, S. O., Gallo, R., Badimon, J. J., Taubman, M. B., & Marks, A. R. (1996). Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *The Journal of clinical investigation*, 98(10), 2277–2283.
- Post, M. J., Smet, B. J. de, van der Helm, Y., Borst, C., & Kuntz, R. E. (1997). Arterial remodeling after balloon angioplasty or stenting in an atherosclerotic experimental model. *Circulation*, 96(3), 996–1003.
- Prati, F., Zimarino, M., Stabile, E., Pizzicannella, G., Fouad, T., Rabozzi, R., et al. (2008). Does optical coherence tomography identify arterial healing after stenting? An in vivo comparison with histology, in a rabbit carotid model. *Heart (British Cardiac Society)*, 94(2), 217–221.
- Prati, F., Regar, E., Mintz, G. S., Arbustini, E., Di Mario, C., Jang, I.-K., et al. (2010). Expert review document on methodology, terminology, and clinical applications of optical coherence tomography: physical principles, methodology of image acquisition, and clinical application for assessment of coronary arteries and atherosclerosis. *European heart journal*, 31(4), 401–415.
- Purcell-Huynh, D. A., Farese, R. V., Johnson, D. F., Flynn, L. M., Pierotti, V., Newland, D. L., et al. (1995). Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high-fat diet. *The Journal of clinical investigation*, 95(5), 2246–2257.
- Rajagopal, V., & Rockson, S. G. (2003). Coronary restenosis: a review of mechanisms and management. *The American journal of medicine*, 115(7), 547–553.
- Regar, E., Schaar, J. A., Mont, E., Virmani, R., & Serruys, P. W. (2003). Optical coherence tomography. *Cardiovascular radiation medicine*, 4(4), 198–204.
- Roskamm, H., Neumann, F.-J., Kalusche, D., & Bestehorn, H.-P. (Eds.) (2004). *Herzkrankheiten: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie; 138 Tab* (5., vollst. überarb. und aktualis., pp. 463-497). Berlin; Heidelberg [u.a.]: Springer.

- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362(6423), 801–809.
- Rudel, L. L. (1997). Genetic factors influence the atherogenic response of lipoproteins to dietary fat and cholesterol in nonhuman primates. *Journal of the American College of Nutrition*, 16(4), 306–312.
- Russell, J. C., & Amy, R. M. (1986). Early atherosclerotic lesions in a susceptible rat model. The LA/N-corpulent rat. *Atherosclerosis*, 60(2), 119–129.
- Russell, J. C., Graham, S. E., & Richardson, M. (1998). Cardiovascular disease in the JCR:LA-cp rat. *Molecular and cellular biochemistry*, 188(1-2), 113–126.
- Ruygrok, P. N.; Desaga, M.; van Den Branden, F.; Rasmussen, K.; Suryapranata, H.; Dorange, C.; Veldhof, S.; Serruys, P. W. (2007). One year clinical follow-up of the XIENCE V Everolimus-eluting stent system in the treatment of patients with de novo native coronary artery lesions: the SPIRIT II study. *EuroIntervention (EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology)*, 3(3), 315-320.
- Saville, D. J. (1990). Multiple Comparison Procedures: The Practical Solution. *American Statistician*. 44 (2), 174-180.
- Schäfer-Korting, M. (Ed.) (2010). *Drug delivery* (pp. 299-345). Heidelberg; New York: Springer-Verlag.
- Schmid, C. (2002). *Leitfaden Erwachsenenherzchirurgie: Mit 9 Tabellen* (pp. 1-17). Darmstadt: Steinkopff.
- Schwartz, R. S., Huber, K. C., Murphy, J. G., Edwards, W. D., Camrud, A. R., Vlietstra, R. E., & Holmes, D. R. (1992). Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *Journal of the American College of Cardiology*, 19(2), 267–274.
- Serruys, P. W., Jaegere, P. de, Kiemeneij, F., Macaya, C., Rutsch, W., Heyndrickx, G., et al. (1994). A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *The New England journal of medicine*, 331(8), 489–495.
- Shiomi, M., Ito, T., & Watanabe, Y. (1987). Increase in hepatic low-density lipoprotein receptor activity during pregnancy in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits; an animal model for familial hypercholesterolemia. *Biochimica et biophysica acta*, 917(1), 92–100.
- Sigwart, U., Puel, J., Mirkovitch, V., Joffre, F., & Kappenberg, L. (1987). Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *The New England journal of medicine*, 316(12), 701–706.

- Smet, B. J. de, van der Zande, J., van der Helm, Y. J., Kuntz, R. E., Borst, C., & Post, M. J. (1998). The atherosclerotic Yucatan animal model to study the arterial response after balloon angioplasty: the natural history of remodeling. *Cardiovascular research*, 39(1), 224–232.
- Stary, H. C. (1987). Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis*, 64(2-3), 91–108.
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Rosenfeld, M. E., et al. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*, 14(5), 840–856.
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., et al. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 15(9), 1512–1531.
- Statistisches Bundesamt (2011): 2010:Herz-/Kreislaufkrankungen verursachten rund 41 % aller Sterbefälle. URL: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2011/09/PD11_354_232.html. Stand: 08.08.2012
- Steffel, J., Lüscher, T. F., & Tanner, F. C. (2006). Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation*, 113(5), 722–731.
- Steffel, J., Lüscher, T., & Brunckhorst, C. (2011). *Herz-Kreislauf* (pp. 44-70). Heidelberg: Springer.
- Swindle, M. M., Horneffer, P. J., Gardner, T. J., Gott, V. L., Hall, T. S., Stuart, R. S., et al. (1986). Anatomic and anesthetic considerations in experimental cardiopulmonary surgery in swine. *Laboratory animal science*, 36(4), 357–361.
- Tahara, S., Chamié, D., Baibars, M., Alraies, C., & Costa, M. (2011). Optical coherence tomography endpoints in stent clinical investigations: strut coverage. *The international journal of cardiovascular imaging*, 27(2), 271–287.
- Takada, K., Yokohama, I., Chida, K., & Noda, J. (1987). New measurement system for fault location in optical waveguide devices based on an interferometric technique. *Applied optics*, 26(9), 1603–1606.
- Tanzawa, K., Shimada, Y., Kuroda, M., Tsujita, Y., Arai, M., & Watanabe, H. (1980). WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS letters*, 118(1), 81–84.

- Tearney, G. J., Brezinski, M. E., Boppart, S. A., Bouma, B. E., Weissman, N., Southern, J. F., et al. (1996). Images in cardiovascular medicine. Catheter-based optical imaging of a human coronary artery. *Circulation*, 94(11), 3013.
- Templin, C., Meyer, M., Müller, M. F., Djonov, V., Hlushchuk, R., Dimova, I., et al. (2010). Coronary optical frequency domain imaging (OFDI) for in vivo evaluation of stent healing: comparison with light and electron microscopy. *European heart journal*, 31(14), 1792–1801.
- Toth, P. P., & Cannon, C. P. (Eds.) (2010). *Comprehensive cardiovascular medicine in the primary care setting* (pp. 243-263). New York; Dordrecht; Heidelberg [etc.]: Human Press.
- Turco, M. A., Ormiston, J. A., Popma, J. J., Mandinov, L., O'Shaughnessy, C. D., Mann, T., et al. (2007). Polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS Liberté stent in de novo lesions: the pivotal TAXUS ATLAS trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(16), 1676–1683.
- Véniant, M. M., Zlot, C. H., Walzem, R. L., Pierotti, V., Driscoll, R., Dichek, D., et al. (1998). Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice. *The Journal of clinical investigation*, 102(8), 1559–1568.
- Virchow, R. (1856). *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin* (pp. 219-733). Frankfurt A.M.: Meidinger Sohn & Comp.
- Virmani, R.; Burke, A. P.; Farb, A.; Atkinson, J. B. (2001). *Cardiovascular pathology* (2nd, pp. 26-54). Philadelphia: Saunders.
- Virmani, R., Kolodgie, F. D., Farb, A., & Lafont, A. (2003). Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart (British Cardiac Society)*, 89(2), 133–138.
- Virmani, R., Guagliumi, G., Farb, A., Musumeci, G., Grieco, N., Motta, T., et al. (2004). Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation*, 109(6), 701–705.
- Virmani, R., & Kolodgie, F. D. (2011). Pathology of stents and stent endografts. In M. K. Eskandari, M. D. Morasch, W. H. Pearce, & J. S. T. Yao (Eds.), *Endovascular technology. Modern Trends in Vascular Surgery* (pp. 53–71). Shelton: PMPH-USA.
- Waller, B. F. (1989). "Crackers, breakers, stretchers, drillers, scrapers, shavers, burners, welders and melters"--the future treatment of atherosclerotic coronary artery disease? A clinical-morphologic assessment. *Journal of the American College of Cardiology*, 13(5), 969–987.
- WHO = World Health Organization (2011): Cardiovascular diseases. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>. Stand: 08.08.2012

- Wilson, G. J., Nakazawa, G., Schwartz, R. S., Huibregtse, B., Poff, B., Herbst, T. J., et al. (2009). Comparison of inflammatory response after implantation of sirolimus- and paclitaxel-eluting stents in porcine coronary arteries. *Circulation*, 120(2), 141-9, 1-2.
- Winkhardt, M. (2005). *Das Herzkatheterlabor: Einführung in die Aufgabenbereiche des kardiologischen Assistenzpersonals* (pp. 19-32). [New York]: Steinkopff Verlag Darmstadt Germany.
- Wiskirchen, J., Schöber, W., Scharf, N., Kehlbach, R., Wersebe, A., Tepe, G., et al. (2004). The effects of paclitaxel on the three phases of restenosis: smooth muscle cell proliferation, migration, and matrix formation: an in vitro study. *Investigative radiology*, 39(9), 565–571.
- Yabushita, H. (2002). Characterization of Human Atherosclerosis by Optical Coherence Tomography. *Circulation*, 106(13), 1640–1645.
- Yamaguchi, T., Terashima, M., Akasaka, T., Hayashi, T., Mizuno, K., Muramatsu, T., et al. (2008). Safety and feasibility of an intravascular optical coherence tomography image wire system in the clinical setting. *The American journal of cardiology*, 101(5), 562–567.
- Zähringer, M. (2006). Perkutane bildgesteuerte Interventionen. In E. Bücheler, H.-J. Lackner, & M. Thelen (Eds.), *Einführung in die Radiologie. Diagnostik und Interventionen* (11th ed., pp. 758–794). Stuttgart: Thieme.
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A., & Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5081), 468–471.
- Zilberman, M., Kraitzer, A., Grinberg, O., & Elsner, J. J. (2010). Drug-Eluting Medical Implants. In M. Schäfer-Korting (Ed.), *Drug delivery* (pp. 299–345). Heidelberg; New York: Springer-Verlag.

11. Anhang

11.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| A. | Arterie |
| AHA | American Heart Association |
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser |
| atm | physikalische Atmosphäre |
| BMS | Bare-metal Stents = unbeschichtete Stents |
| Chol | Cholesterin |
| CPD | Critical Point Dryer = Kritischer-Punkt-Trockner |
| CRP | C-reaktives Protein |
| d | Tag |
| DES | Drug-eluting Stents = medikamentenbeschichtete Stents |
| EEL | External Elastic Lamina = Lamina elastica externa |
| FeCl ³ | Eisen-III-Chlorid |
| g | Gramm |
| HCL | Salzsäure |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| H&E | Hämatoxylin -Eosin-Färbung |
| H ₂ O | Wasser |
| IEL | Internal Elastic Lamina = Lamina elastica interna |
| IL-1 | Interleukin-1 |
| KHK | Koronare Herzkrankheit |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| MCP-1 | Monocyte Chemoattractant Protein-1 |
| 2-MEA | 2-Methoxyethylacetat |
| mg | Milligramm |
| min. | Minuten |
| ml | Milliliter |
| MMA | Methylmetacrylat |
| NO | Stickoxid |
| NZW | New Zealand White |
| OCT | Optical Coherence Tomography = Optische Kohärenz- tomographie |

| | |
|--------------|---|
| PBS | Phosphate Buffered Saline = Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCI | Percutaneous Coronary Intervention Perkutane Koronar-intervention |
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor |
| PLA | Poly-Lactid Acid = Polylaktat |
| PTCA | Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie |
| REM | Rasterelektronenmikroskopie |
| sek. | Sekunden |
| TF | Tissue Factor |
| TNF α | Tumornekrosefaktor- α |
| VCAM-1 | Vascular Cell Adhesion Molecule-1 |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VLDL | Very Low Density Lipoprotein |
| vWF | Von-Willebrand-Faktor |

11.2 Implantationsmatrix

11.2.1 Untersuchung mittels Histologie und OCT nach 28 und 42 Tagen

| <u>28 Tage</u> | | | <u>42 Tage</u> | | |
|----------------|------------------------------------|----------------------------------|----------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Tier-ID | linkes Iliakalgefäß | rechtes Iliakalgefäß | Tier-ID | linkes Iliakalgefäß | rechtes Iliakalgefäß |
| 37_09 | EndRes 3,0x12 mm | Driver [®] 3,0x12 mm | 3_11 | Xience V [®] 2,5x12 mm | Driver [®] 2,5x12 mm |
| 38_09 | Driver [®] 3,0x12 mm | EndRes 3,0x12 mm | 4_11 | EndRes 2,5x12 mm | Xience V [®] 2,5x12 mm |
| 39_09 | EndRes 3,0x12 mm | Driver [®] 3,0x12 mm | 5_11 | Driver [®] 2,5x12 mm | EndRes 2,5x12 mm |
| 40_09 | Driver [®] 3,0x12 mm | EndRes 3,0x12 mm | 7_11 | Xience V [®] 2,5x12 mm | Driver [®] 2,5x12 mm |
| 17_10 | Xience V [®] 2,5x12 mm | EndRes 2,5x12 mm | 9_11 | Xience V [®] 2,5x12 mm | EndRes 2,5x12 mm |

| | | | | | |
|-------|------------------------------------|------------------------------------|-------|----------------------------------|------------------------------------|
| 18_10 | Xience V [®] 2,5x12 mm | Xience V [®] 2,5x12 mm | 10_11 | Driver [®] 2,5x12 mm | EndRes 2,5x12 mm |
| 12_11 | Xience V [®] 2,5x12 mm | Driver [®] 2,5x12 mm | 11_11 | EndRes 2,5x12 mm | Xience V [®] 2,5x12 mm |
| 14_11 | Driver [®] 2,5x12 mm | Xience V [®] 2,5x12 mm | 13_11 | EndRes 2,5x12 mm | Driver [®] 2,5x12 mm |
| 15_11 | Xience V [®] 2,5x12 mm | EndRes 2,5x12 mm | 16_11 | Driver [®] 2,5x12 mm | Xience V [®] 2,5x12 mm |

EndRes = Endeavor[®] Resolute

11.2.2 Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskopie nach 28 Tagen

| Tier-ID | linkes Iliakalgefäß | rechtes Iliakalgefäß |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|
| 23_10 | Driver [®] 2,5x12 mm | Xience V [®] 2,5x12 mm |
| 24_10 | EndRes 2,5x12 mm | Driver [®] 2,5x12 mm |
| 25_10 | Xience V [®] 2,5x12 mm | EndRes 2,5x12 mm |
| 26_10 | EndRes 2,5x12 mm | Xience V [®] 2,5x12 mm |

EndRes = Endeavor[®] Resolute

11.3 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

- Aceton Rotipuran[®] ≥99,8%; Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Acid Fuchsin; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Alcian Blue 8GX; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Ammoniaklösung, A.C.S. Reagenz; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Aniline Blue, diammonium salt, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Benzoylperoxide (with 25% H₂O); Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Crocein Scarlet 7B; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

- Eisen-III-Chlorid; Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Eosin Y, spirit soluble; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Essigsäure 100%; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol absolut reinst; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Formaldehydlösung säurefrei $\geq 37\%$; Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Fuchsin basisch; Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Gelatine, Type B: From Bovine Skin; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Glycerol, Electrophoresis Reagent $>99\%$; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Hämatoxylin krist.; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Jod $>99,5\%$, Ph.Eur., resumblert; Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Kaliumjodid; Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Mayers Hematoxylin; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Methanol Rotipuran[®] $\geq 99,9\%$; Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- (2-Methoxyethyl)-acetat; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Methylmetacrylat; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Natriumthiosulfat, wasserfrei; Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Nonylphenyl-polyethylenglykol Acetat; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Osmium Tetroxide; VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
- PBS (1x) Dulbecco's; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Phenol krist., reinst; NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Phloxine B; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Phosphowolframsäure Hydrat; FLUKA (Sigma-Aldrich), Steinheim, Deutschland
- Ponceau Xylidine; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Safran du Gatinais; Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
- Salzsäure 25%; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

- Toluidine Blue O; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
- Xylol (Isomere) >98% rein, für die Histologie; Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

11.4 Protokolle zur Herstellung der Färbelösungen/sonstige Reagenzien

Lösungen für modifizierte Movat-Pentachrom-Färbung

- Working Hematoxylin-Lösung
 - 30 ml 10 % alkoholisches Hämatoxylin
 - 30 ml 96 % Ethanol
 - 30 ml 10 % Eisen-III-Chlorid
 - 30 ml Verhoeff's Jod-Lösung
 - 10 % alkoholisches Hämatoxylin
 - 10 g Hämatoxylin
 - 100 ml 100 % Ethanol
 - Verhoeff's Jod-Lösung
 - 2 g Jodkristalle
 - 4 g Kaliumjodid
 - 100 ml deionisiertes Wasser
 - 10 % bzw. 2 % Eisen-III-Chlorid
 - 10 g bzw. 2 g Eisen-III-Chlorid
 - 100 ml deionisiertes Wasser
- 5 % Natriumthiosulfat
 - 5 g Natriumthiosulfat
 - 100 ml deionisiertes Wasser
- 1 % Alzianblau
 - 1 g Alzianblau
 - 100 ml 1 % Essigsäure
- Woodstain Scarlet Working Solution
 - 80 ml der Lösung „A“
 - 20 ml der Lösung „B“
 - Lösung „A“

- 0,1 g Crocein Scarlet
 - 99,5 ml deionisiertes Wasser
 - 0,5 ml Eisessig
 - Lösung „B“
 - 0,1 g Acid Fuchsin
 - 99,5 ml deionisiertes Wasser
 - 0,5 ml Eisessig
 - 0,5 % Essigsäure
 - 0,5 ml Eisessig
 - 99,5 ml deionisiertes Wasser
 - 5 % Phosphowolframsäure
 - 5 g Phosphowolframsäure
 - 100 ml deionisiertes Wasser
 - alkoholische Safran-Lösung
 - 6 g Safran du Gatinais
 - 100 ml 100 % Ethanol
- gut vermischen, Lösung über Nacht stehen lassen und am nächsten Tag dekantieren

Lösungen für Hämatoxylin-Eosin-Färbung

- Eosin Y/Phloxine B Working Solution
 - 100 ml 1 % Eosin Y Stammlösung
 - 10 ml 1 % Phloxin B Stammlösung
 - 780 ml 95 % EtOH
 - 4 ml Eisessig
 - 1 % Eosin Y Stammlösung
 - 1 g Eosin Y, wasserlöslich
 - 100 ml deionisiertes Wasser
 - 1 % Phloxin B Stammlösung
 - 1 g Phloxin B
 - 100 ml deionisiertes Wasser
- Ammoniumwasser
 - 4-5 Tropfen konzentriertes Ammoniumhydroxid in 1000 ml Leitungswasser geben

Herstellung des MMA-Polymerisationsgemisches:

- 200 ml Methylmethacrylat
- 7 g getrocknetes Benzoylperoxid Pulver
- 50 ml Nonylphenyl-polyethylenglykol Acetat

Herstellung der Haupt's Adhäsions Reagenz:

- 1 g Gelatine in 100 ml Aqua dest bei 30 °C lösen
- 2 g Phenol
- 15 ml Glycerol

12. Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. med. Michael Joner für die Bereitstellung und Finanzierung dieser Doktorarbeit, der ausgezeichneten Betreuung und dem mir entgegengebrachten Vertrauen.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. med. vet. Rüdiger Wanke für die Betreuung und Einreichung dieser Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig – Maximilians – Universität, München.

Bei Dr. med. vet. Kristin Steigerwald bedanke ich mich ganz herzlich für die hervorragende Einarbeitung, Betreuung und wirklich aufopfernde Hilfe an sieben Tagen die Woche.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Elisabeth „Uschi“ Kennerknecht, Anna Titova und Liang Li, mit denen ich sowohl während als auch außerhalb des Klinikalltags immer viel Spaß hatte und die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Vielen Dank auch an die Tierpfleger des ZPF (Luise, Jasmin, Dennis und Stefan) für die hervorragende Pflege meiner Kaninchen und die Erfüllung mancher Sonderwünsche an den Wochenenden.

Frau Hertel und Frau Pohlheimer danke ich für die Vorbereitungen der Operationen und für die „kleine Schokolade für zwischendurch“.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. med. Tomohisha Tada und dem Team des QCA Labors für die Auswertung und Überlassung der humanen Daten bedanken.

Vielen Dank an Prof. Waschke der anatomischen Anstalt der LMU für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und des Sägemikrotoms.

Ich möchte mich auch bei PD Dr. S. Reese und Dr. T. Schuster für die ausgezeichnete Beratung und Hilfestellung bei der (für mich unglaublich komplizierten) statistischen Auswertung der Daten.

Meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre bedingungslose Unterstützung und den seelischen Rückhalt. Ohne sie wäre mein Studium und somit auch diese Dissertation nicht möglich gewesen.